



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO**  
**CAMPUS DIADEMA**



**LILLIAN FERREIRA DOS SANTOS NASCIMENTO**

**NOVAS ARIL-METIL-PIPERAZINAS DA SÉRIE LINS01 COMO  
LIGANTES DE RECEPTORES DE HISTAMINA H<sub>3</sub>R/H<sub>4</sub>R**

**DIADEMA – SP**  
**2019**

**LILLIAN FERREIRA DOS SANTOS NASCIMENTO**

**NOVAS ARIL-METIL-PIPERAZINAS DA SÉRIE LINS01 COMO  
LIGANTES DE RECEPTORES DE HISTAMINA H<sub>3</sub>R/H<sub>4</sub>R**

Dissertação apresentada, como exigência  
para obtenção do título de Mestre em  
Ciências, ao Programa de Pós-Graduação  
*Strictu Sensu* em Ciências Farmacêuticas  
da Universidade Federal de São Paulo –  
Campus Diadema.

Orientador: Prof. Dr. João Paulo dos  
Santos Fernandes

**DIADEMA – SP**

**2019**

Nascimento, Lillian Ferreira dos Santos

Novas aril-metil-piperazinas da série LINS01 como ligantes de receptores de histamina H<sub>3</sub>R/H<sub>4</sub>R / Lillian Ferreira dos Santos Nascimento . -- Diadema, 2019.

148 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de São Paulo - Campus Diadema, 2019.

Orientador: João Paulo dos Santos Fernandes

1. Histamina. 2. Receptores histaminérgicos H<sub>3</sub> e H<sub>4</sub>. 3. Ligantes H<sub>3</sub>. 4. Ligantes H<sub>4</sub>. 5. Síntese de compostos bioativos.  
I. Título.

CDD 615.19

**LILLIAN FERREIRA DOS SANTOS NASCIMENTO**

**NOVAS ARIL-METIL-PIPERAZINAS DA SÉRIE LINS01 COMO  
LIGANTES DE RECEPTORES DE HISTAMINA H<sub>3</sub>R/H<sub>4</sub>R**

Dissertação apresentada, como exigência  
para obtenção do título de Mestre em  
Ciências, ao Programa de Pós-Graduação  
*Strictu Sensu* em Ciências Farmacêuticas  
da Universidade Federal de São Paulo –  
Campus Diadema.

Aprovado em 31/05//2019.

**COMISSÃO EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Roberto Parise Filho

---

Profa. Dra. Daniela Gonçalves Galasse Rando

---

Prof. Dr. Luiz Elidio Gregório

**DIADEMA – SP  
2019**

*Dedico este trabalho a Deus, meu ajudador, meu Pai e amigo, que com seu amor incondicional permitiu a realização deste sonho. Ao meu esposo José, que com todo seu amor, apoio, companheirismo e compreensão foi fundamental para a conclusão deste trabalho. Aos meus pais, irmãos e sobrinhos que são a minha fonte de inspiração e minha base para todos os momentos. Amo vocês.*

## **Agradecimentos**

Agradeço primeiramente a Deus, autor da minha vida e fé, por permitir que esse sonho se tornasse real. Antes de nascer no meu coração, esse sonho já estava projetado para mim no Seu coração, Deus. Sou imensamente grata a Ti por tudo... tudo o que aprendi e por estar ao meu lado em todos os momentos, até mesmo naqueles nos quais achei que não conseguiria... mas Pai, o Senhor esteve ali. Como está escrito na Sua palavra “Todas as coisas cooperam para o bem daqueles que amam a Deus” (Rm 8:28) e “Ele é antes de todas as coisas. Nele, tudo subsiste” (Cl 1:17) eu tenho a certeza que desde o início tudo foi arquitetado por Ti e para louvor da Sua glória. Não há palavras que possam expressar o meu amor e gratidão... minha alma engrandece a Ti eternamente.

Ao meu esposo, José. Amor, obrigada por todo seu carinho, amor, paciência, conselhos, pela sua calma, por me transmitir paz, confiança e por ser o meu incentivador dia após dia! Obrigada por assistir minhas apresentações antecipadamente e por diversas vezes... e mesmo atuando em uma área totalmente diferente, se esforçava para entender. Aprendi o significado de casamento com parceria em todos os momentos! Você me fez forte! Eu te amo!

Aos meus pais. Mãe e pai... vocês foram essenciais durante essa caminhada! Na verdade, devo tudo a vocês, pois desde a minha formação inicial vocês sempre fizeram o impossível para que nós (meus irmãos e eu) nunca desistíssemos dos nossos sonhos. Agradeço por todas as orações por mim, por todo apoio e amor, por todos os almoços preparados aos finais de semana para que pudéssemos pelo menos uma vez na semana nos reunirmos. Amo vocês!

Aos meus irmãos, sobrinhos e cunhados. Ju e Dan, vocês são os melhores presentes que recebi dos nossos pais, amo vocês sem limites! Obrigada por trazerem a minha vida o sabor de ser tia, vocês não imaginam como o Davi e a Mari, pedacinhos também de mim, trazem a luz e calor do sol aos meus dias nublados e chuvosos! Meu coração até dói de amor por eles!

À toda a minha família de perto e de longe, sei que vocês estavam torcendo por mim! A minha sogra, Maria e a toda sua família, cunhadas (minhas cunhas) e cunhados, sobrinhos que me foi dada quando me uni ao José. Obrigada pela compreensão às minhas ausências e cada interseção a Deus pela minha vida! Vocês são mais que família, vocês meus irmãos na fé e eu os amo!

Agradeço também a muitos dos meus amigos, que se fosse possível citar todos, não caberiam nessas folhas. Entretanto, eu gostaria de agradecer a dois destes, pois foram muito importantes nessa jornada. À Mayara, já intitulada mestre por essa instituição. Amiga, obrigada pelo incentivo desde o início! Você tem uma forma muito especial de motivar os sonhos das pessoas que te cercam! Obrigada de coração. Ao Álefe, também mestre por essa instituição, amigo que me recebeu muito bem no grupo de pesquisa e sempre esteve disposto a ajudar. Obrigada por todo apoio!

Ao Professor João Paulo por me receber no seu grupo de pesquisa e por depositar um pouco da sua confiança em mim. Prof, gratidão. Esse é o sentimento que tenho quando vejo o quanto cresci nesse período que trabalhamos juntos e devo a ti pela oportunidade. Muito obrigada por tudo o que aprendi com você! Deus te abençoe!

Ao professor Dr. Cláudio Miguel da Costa-Neto (Departamento de Bioquímica e Imunologia – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP) pela parceria nos testes de *binding* e por ceder gentilmente os resultados para serem apresentados nessa dissertação.

Aos laboratórios LINS, CEMS e NIPE por toda infraestrutura. Aos professores e alunos do LINS, que a cada dia se desafiam e se descobrem através da pesquisa realizada ali.

À Instituição Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), pela solidez de processos, seriedade com seus alunos e ainda pelo tão desejado título.

Às instituições de fomento de pesquisa: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, processo 455411-4/2014), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, processo 2016/25028-3) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoas de Nível Superior (CAPES) por financiar todo o projeto de pesquisa.

Minha gratidão a todos que fizeram parte dessa trajetória! Deus retribua a cada um!

*“Confie no Senhor de todo o teu coração e não se apoie na sua própria inteligência. Lembre-se de Deus em tudo o que fizer, e Ele lhe mostrará o caminho certo. Não pense que você é sábio. Tema ao Senhor e não faça nada que seja errado.*

*Pois isso será como um bom remédio para curar as suas feridas e aliviar os seus sofrimentos.”*

*Provérbios 3:5-9*

*“Eu não tenho nenhum talento especial. Apenas sou apaixonadamente curioso”*

- Albert Einstein.



## RESUMO

A histamina é uma importante amina biogênica distribuída amplamente em todos os tecidos. Desempenha papel importante na fisiologia e homeostase do organismo, assim como nos processos alérgicos e inflamatórios. Seus efeitos são observados através da interação com quatro receptores histaminérgicos acoplados a proteína G denominados como H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub> e H<sub>4</sub>, sendo que a sinalização celular que prossegue a ativação de cada receptor, são distintas. Os quatro receptores histaminérgicos são alvos importantes para tratamento de diversas doenças. Os dois primeiros receptores identificados já foram intensamente pesquisados e já possuem aplicação definida na terapêutica. O receptor H<sub>3</sub> foi caracterizado como auto e heterorreceptor e é encontrado majoritariamente no sistema nervoso central (SNC). Tornou-se assim um alvo promissor para tratamento de distúrbios do SNC. Por ter sido caracterizado mais tardiamente, receptor H<sub>4</sub>, presente principalmente nas células de origem hematopoiéticas, vem sendo estudado por diversos grupos de pesquisas como alvo para tratamento de doenças imunológicas e inflamatórias. Devido a homologia entre os receptores H<sub>3</sub> e H<sub>4</sub> muitos ligantes podem ter afinidade por ambos receptores. Assim, moléculas com atividade antagonista ou agonista inverso para os receptores H<sub>3</sub> e/ou H<sub>4</sub> demonstram relevância no tratamento de diversas doenças que envolvam isolada ou combinadamente estes receptores. Diante disto, a proposta deste trabalho foi sintetizar moléculas baseadas na série LINS 01 com o maior rendimento e pureza possível, avaliar a afinidade destas pelos receptores H<sub>3</sub> e/ou H<sub>4</sub> e verificar sua atividade como antagonista ou agonista. A síntese dos ligantes envolveram etapas como alilação, rearranjo de Claisen e aminação redutiva, resultando em intermediários que apresentaram rendimento bruto de 25 a 93%. Os compostos planejados neste trabalho não foram obtidos devido ao insucesso de etapas químicas (baixo rendimento e/ou a não obtenção do produto desejado) e de purificação. Assim, alguns intermediários obtidos foram testados através do teste de *binding*, porém apresentaram afinidade muito baixa em ambos receptores e assim não foi possível avaliar suas atividades como antagonistas ou agonistas nos receptores H<sub>3</sub> e H<sub>4</sub>.

**Palavras-chave:** 1. Histamina. 2. Receptores histaminérgicos H<sub>3</sub> e H<sub>4</sub>. 3. Ligantes H<sub>3</sub>. 4. Ligantes H<sub>4</sub>. 5. Síntese de compostos bioativos.

## ABSTRACT

Histamine is an important biogenic amine distributed widely in all tissues. It plays an important role in the physiology and homeostasis of the organism, as well as in allergic and inflammatory processes. Its effects are observed through interaction with four histaminergic receptors G protein-coupled histaminergic receptors called H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub> and H<sub>4</sub>, and the cell signaling that activates each receptor is distinct. The four histaminergic receptors are important targets for the treatment of various diseases. The first two receptors identified were already intensively researched and already have definite application in therapy. The H<sub>3</sub> receptor has been characterized as auto and hetero-receptor and is found mostly in the central nervous system (CNS). It has thus become a promising target for the treatment of CNS disorders. Because it has been characterized later, the H<sub>4</sub> receptor, present mainly in cells of hematopoietic origin, has been studied by several research groups as a target for the treatment of immunological and inflammatory diseases. Due to the homology between the H<sub>3</sub> and H<sub>4</sub> receptors many ligands may have affinity for both receptors. Thus, molecules with antagonistic or inverse agonist activity towards the H<sub>3</sub> and/or H<sub>4</sub> receptors demonstrate relevance in the treatment of several diseases involving alone or in combination these receptors. Therefore, the purpose of this work was to synthesize molecules based on the LINS 01 series with the highest yield and purity possible, to evaluate the affinity of these receptors for H<sub>3</sub> and / or H<sub>4</sub> receptors and to verify their activity as antagonist or agonist. Synthesis of the ligands involved steps such as allylation, Claisen rearrangement and reductive amination, resulting in intermediates which had crude yields of ~ 1 to 93%. The compounds designed in this work were not obtained due to the failure of chemical steps (low yield and / or no yield of the desired product) and purification. Thus, some intermediates obtained were tested through the binding test, but showed very low affinity in both receptors and thus it was not possible to evaluate their activities as antagonists or agonists in H<sub>3</sub> and H<sub>4</sub> receptors.

**Keywords:** 1. Histamine. 2. Histaminergic Receptors H<sub>3</sub> and H<sub>4</sub>. 3. H<sub>3</sub> ligands. 4. H<sub>4</sub> ligands. 5. Synthesis of bioactive compounds.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Histamina .....	19
<b>Figura 2</b> – Tautomerismo da histamina .....	21
<b>Figura 3</b> – Metabolismo da Histamina. ....	22
<b>Figura 4</b> – Piperoxano, descoberto por Forneau e Bovet e considerado o primeiro anti-histamínico. ....	24
<b>Figura 5</b> – Exemplos de anti-histamínicos H <sub>1</sub> de primeira geração. ....	24
<b>Figura 6</b> – Exemplos de anti-histamínicos H <sub>1</sub> de segunda geração. ....	24
<b>Figura 7</b> – Exemplos de anti-histamínicos H <sub>2</sub> . ....	25
<b>Figura 8</b> – Interação da histamina com os resíduos de aminoácidos do receptor H <sub>3</sub> . .....	28
<b>Figura 9</b> – Ligantes agonistas imidazólicos do receptor H <sub>3</sub> . ....	29
<b>Figura 10</b> – Primeiro ligante agonista do receptor H <sub>3</sub> . ....	29
<b>Figura 11</b> – Antagonistas imidazólicos do receptor H <sub>3</sub> . ....	30
<b>Figura 12</b> – Antagonista do receptor H <sub>3</sub> GT-2331. ....	30
<b>Figura 13</b> – UCL-1972. ....	31
<b>Figura 14</b> – Modelo farmacofórico proposto para antagonistas H <sub>3</sub> não-imidazólicos. .....	31
<b>Figura 15</b> – Compostos JNJ-5207852 e ABT-239 antagonistas não-imidazólicos do receptor H <sub>3</sub> . ....	32
<b>Figura 16</b> – Compostos A-331440 e GSK-189254 antagonistas não-imidazólicos do receptor H <sub>3</sub> . ....	33
<b>Figura 17</b> – DL-80.....	33
<b>Figura 18</b> – Pitolisanto.....	34
<b>Figura 19</b> – Interação da histamina com os resíduos de aminoácidos do receptor H <sub>4</sub> . .....	36
<b>Figura 20</b> – Agonistas do receptor H <sub>4</sub> .....	37
<b>Figura 21</b> – Ligantes do receptor H <sub>4</sub> : indolcarboxamida e benzimidazólico.....	38
<b>Figura 22</b> – Ligantes do receptor H <sub>4</sub> : análogos da 2-aminopirimidina e diidrobenzofuranilpiperazina.....	39
<b>Figura 23</b> – Ligantes do receptor H <sub>4</sub> das classes quinazolinas e quinoxalinas.....	40
<b>Figura 24</b> – Ligante do receptor H <sub>4</sub> da classe benzimidazolpirimidina. ....	40
<b>Figura 25</b> – Arcabouço da série LINS e os substituintes já avaliados. ....	41

<b>Figura 26</b> – Compostos N-piperazínicos substituídos da série LINS 01 e resultados de $K_i$ iniciais.....	42
<b>Figura 27</b> – Compostos 5-substituídos da série LINS 01. ....	43
<b>Figura 28</b> – Compostos planejados para este trabalho. ....	47
<b>Figura 29</b> – Procedimento sintético para os diidroindóis. ....	50
<b>Figura 30</b> – Planejamento sintético para os benzofurânicos. ....	51
<b>Figura 31</b> – Alilação da 4-cloroanilina.....	51
<b>Figura 32</b> – Rearranjo de Claisen da N-alil-4-cloroanilina. ....	52
<b>Figura 33</b> – Alilação dos fenóis.....	53
<b>Figura 34</b> – Rearranjo de Claisen dos alil-fenil éteres. ....	54
<b>Figura 35</b> – Preparação dos compostos piperazínicos. ....	55
<b>Figura 36</b> – Brometo de alila.....	59
<b>Figura 37</b> – Carbocátion alílico em ressonância. ....	59
<b>Figura 38</b> – Representação gráfica dos efeitos gerados pela metodologia (convencional para US), tempo de reação (de 1,5 h para 4 h) e quantidade de reagentes (7,5 mmol para 10,0 mmol de ambos, brometo de alila e $K_2CO_3$ ). ....	63
<b>Figura 39</b> – Rearranjo de Claisen aromático. ....	68
<b>Figura 40</b> – Reação de aminação redutiva. ....	73
<b>Figura 41</b> – Intermediários avaliados em teste de binding. ....	84

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Resultados de $pK_i$ obtidos em teste de binding por nova metodologia para os primeiros compostos da série LINS 01.....	44
<b>Tabela 2</b> – Reagentes / materiais utilizados. ....	49
<b>Tabela 3</b> – Rendimentos obtidos na alilação dos fenóis. ....	53
<b>Tabela 4</b> – Rendimentos obtidos no rearranjo dos alil-fenil éteres. ....	54
<b>Tabela 5</b> – Rendimentos obtidos na preparação dos compostos piperazínicos. ....	57
<b>Tabela 6</b> – Rendimento bruto obtido experimentalmente para alilação da 4-cloroanilina. ....	61
<b>Tabela 7</b> – Resultados dos rendimentos para metodologia convencional por 24h. ..	62
<b>Tabela 8</b> – Condições experimentais para avaliar a metodologia, tempo de reação e quantidade de reagentes.....	63

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

<b>%</b>	Porcentagem
<b>°C</b>	Graus Celsius
<b><math>\delta</math></b>	Deslocamento químico, em ppm
<b>AcOEt</b>	Acetato de Etila
<b>Ala</b>	Alanina
<b>Asn</b>	Asparagina
<b>Asp</b>	Aspartato
<b>CESM</b>	Centro de Equipamentos e Serviços Multiusuários
<b>CG-EM</b>	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
<b>CYP450</b>	Enzimas do citocromo P450
<b>Cys</b>	Cisteína
<b>d</b>	Dupleto
<b>DAO</b>	Diamino-oxidase
<b>dd</b>	Duplo dupleto
<b>ddt</b>	Duplo duplo tripleto
<b>dq</b>	Duplo quarteto
<b>dt</b>	Duplo tripleto
<b>DCM</b>	Diclorometano
<b>GABA</b>	Ácido-gama-amino-butírico
<b>EG</b>	Eficiência do grupo
<b>EL</b>	Eficiência dos ligantes
<b>ELCL</b>	Eficiência dos ligantes corrigida pela lipofilicidade

<b>ELL</b>	Eficiência do ligante lipifílico
<b>EMBR</b>	Espectrometria de massas de baixa resolução
<b>GPCRs</b>	Receptores acoplados à proteína G
<b>Glu</b>	Glutamina
<b><i>hERG</i></b>	<i>human ether-a-go-go related gene</i>
<b>Hex</b>	Hexano
<b>Hz</b>	Hertz
<b>IC<sub>50</sub></b>	concentração inibitória, onde o ligante inibe a ligação da [ <sup>3</sup> H]-histamina com o receptor em 50%
<b>IE</b>	Ionização por elétrons
<b><i>J</i></b>	Constante de acoplamento
<b><i>K<sub>i</sub></i></b>	Constante de inibição
<b>LINS</b>	Laboratório de Insumos Naturais e Sintéticos
<b>m</b>	Multiplete
<b>MAO-B</b>	Monoamino-oxidase B
<b><i>m/z</i></b>	Razão massa carga
<b>mg</b>	Miligrama
<b>MHz</b>	Megahertz
<b>mL</b>	Mililitro
<b>μM</b>	micromolar
<b>Phe</b>	Fenilalanina
<b>PI3K</b>	Fosfoinositol-3-quinase
<b>p<i>K<sub>i</sub></i></b>	Logaritmo de <i>K<sub>i</sub></i>
<b>QA</b>	Qualidade do ajuste

<b>REA</b>	Relação estrutura atividade
<b>RMN</b>	Ressonância Magnética Nuclear
<b>RMN - <sup>13</sup>C</b>	Ressonância magnética nuclear de carbono 13
<b>RMN - <sup>1</sup>H</b>	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
<b>sl</b>	Sinal largo
<b>SNC</b>	Sistema Nervoso Central
<b>t</b>	Tripleto
<b>THF</b>	Tetraidrofurano
<b>Thr</b>	Treonina
<b>TMS</b>	Tetrametilsilano
<b>Trp</b>	Triptofano
<b>UNIFESP</b>	Universidade Federal de São Paulo



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>17</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>19</b>
2.1	Histamina.....	19
2.2	Receptores.....	22
2.2.1	Receptor H <sub>1</sub> .....	23
2.2.2	Receptor H <sub>2</sub> .....	25
2.2.3	Receptor H <sub>3</sub> .....	26
2.2.4	Receptor H <sub>4</sub> .....	34
2.3	Estado da arte no grupo.....	41
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>46</b>
3.1	Objetivo.....	46
3.2	Justificativa .....	46
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>49</b>
4.1	Reagentes e vidrarias .....	49
4.2	Equipamentos .....	49
4.3	Estratégia Sintética .....	50
4.3.1	Compostos diidroindólicos .....	51
4.3.2	Compostos benzofurânicos.....	53
4.4	Caracterização estrutural e de pureza.....	58
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>59</b>
5.1	Síntese dos compostos .....	59
5.2	Ensaio de <i>binding</i> .....	84
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>88</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>89</b>
	<b>APÊNDICES.....</b>	<b>98</b>
	<b>ANEXO A.....</b>	<b>147</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A histamina, 2-(4-imidazol)-etilamina, é um mediador químico presente em vários tecidos. É sintetizada e armazenada em mastócitos, basófilos, células enterocromafins-*like* no estômago e nos neurônios histaminérgicos no SNC (HUANG et al., 2018). A ação da histamina está relacionada principalmente com algumas funções fisiológicas (BRUNTON et al., 2010).

A histamina possui receptores específicos de atuação e são encontrados na literatura quatro tipos de receptores histaminérgicos denominados H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub> e H<sub>4</sub>. São receptores localizados na membrana celular, acoplados à proteína G (GPCRs) e a ativação de cada receptor que é mediada pela amina biogênica, desencadeia respostas celulares distintas entre si (PARSONS; GANELLIN, 2006).

O receptor H<sub>1</sub> é encontrado em praticamente todos os tecidos do organismo humano, tanto periféricos quanto centrais e são os principais responsáveis pelos efeitos observados nos quadros de inflamação e alergia. Com base nas características apresentadas através da ativação deste receptor, foram desenvolvidos os anti-histamínicos H<sub>1</sub> divididos em primeira e segunda geração (SIMONS; SIMONS, 2011). O receptor H<sub>2</sub> está envolvido no controle da liberação do ácido gástrico no estômago e os antagonistas do H<sub>2</sub> ganharam lugar de destaque na terapêutica para o tratamento da úlcera péptica e doença do refluxo gastroesofágico (PARSONS; GANELLIN, 2006).

Em 1983, Arrang e colaboradores identificaram um novo receptor histaminérgico durante estudos experimentais, o receptor H<sub>3</sub> (ARRANG; GARBARG; SCHWARTZ, 1983). Sua distribuição é majoritariamente no SNC, no entanto, foi localizado também em células do trato gastrointestinal, vias aéreas e vasos sanguíneos (LEMKE et al., 2012; TIMMERMAN; VAN DER GOOT, 2009). É classificado como um auto e heterorreceptor, modulando a liberação de histamina e de outros neurotransmissores no SNC, por isso, antagonistas para este receptor podem ser aplicados na terapêutica no tratamento de distúrbios do SNC como doença de Alzheimer, Parkinson, déficit de atenção e hiperatividade, epilepsia, distúrbio do sono, entre outras (NIETO-ALAMILLA et al., 2016). Recentemente, o pitolisanto (Wakix®) foi aprovado para tratar a narcolepsia em adultos, com ou sem cataplexia (SYED, 2016).

O receptor  $H_4$  foi o último a ser identificado e, ainda no início do século XXI, diversos grupos de pesquisa direcionaram esforços para caracterizar este receptor (PANULA et al., 2015). São expressos nas células do sistema imunológico, mastócitos, eosinófilos, monócitos, entre outros e estão envolvidos diretamente na resposta imunomodulatória (JEMIMA; PREMA; THANGAM, 2014) e diante disso, ligantes com atividade antagonista ou agonista inversa apresentam significativa importância e podem ser promissores para o tratamento de doenças que dependem de células do sistema imunológico, tais como asma, artrite reumatoide, dermatites e rinite alérgica (CORRÊA; FERNANDES, 2018).

Os modelos farmacofóricos dos ligantes  $H_3$  podem ser estendidos aos ligantes  $H_4$  devido à relativa homologia que os receptores apresentam entre si e por isso, é provável que ligantes de um dos receptores tenham afinidade pelo outro. Essa ação conjunta em ambos receptores pode ser benéfica, principalmente no tratamento de fisiopatologias como dor neuropática, câncer e na doença de Parkinson (CORRÊA et al., 2017a).

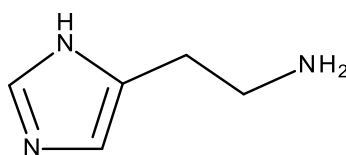
Diante do exposto, nosso grupo de pesquisa vêm buscando há alguns anos ligantes bioativos para os receptores  $H_3$  e  $H_4$ , contendo o anel benzodi-idro-heterocíclico e o grupo piperazínico (série LINS 01) que apresenta similaridade estrutural com ligantes que possuem atividade antagonista / agonista inverso já publicados na literatura e tem alcançado resultados bastante promissores. Assim, as moléculas 2-metilbenzofurânicas (LINS 01016 a LINS 01019) e diidroindólicas (LINS 01002 e LINS 01015) inicialmente planejadas para este trabalho objetivariam através do retroisosterismo e bioisosterismo respectivamente, avaliar a aromaticidade no núcleo heterociclo, assemelhando-se aos compostos protótipos (JNJ 7777120 e ABT-239) e ausência da carbonila para a afinidade por tais receptores. Entretanto, os compostos alcançados neste trabalho foram as aril-metil-piperazinas, que são os intermediários das moléculas alvo e alguns destes foram avaliados quanto a afinidade para os receptores  $H_3$  e  $H_4$ .

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Histamina

Amplamente pesquisada entre as aminas biogênicas, a histamina, 2-(4-imidazol)-etilamina (figura 1) foi obtida quimicamente em 1907 por Windaus e Vogt (MAHDY, WEBSTER, 2017). Ainda no início do século XX, em 1910, Henry Dale e Patrick Laidlaw evidenciaram a ação da histamina em diferentes órgãos de musculatura lisa, antes mesmo da comprovação da presença deste mediador químico nos tecidos. Esta comprovação ocorreria em 1927 por Best e colaboradores, cuja histamina seria extraída e isolada de amostras de fígado e pulmão (BRUNTON et al., 2010).

**Figura 1 – Histamina**



A pesquisa da presença de histamina no cérebro foi impulsionada após observação dos efeitos colaterais, como a sedação, que os anti-histamínicos de primeira geração apresentavam sobre SNC e em 1943, Kwiatkowski extraiu e isolou a histamina de amostra do córtex cerebral. Em continuação a esses estudos, a histamina foi considerada um possível neurotransmissor a partir da sua presença em outras regiões cerebrais (HU; CHEN, 2017; SADEK et al., 2016).

Encontrada praticamente em todos os tecidos, a histamina, entretanto, pode ser classificada em dois grupos de acordo com sua localização: histamina neuronal e não-neuronal, uma vez que não atravessa a barreira hematoencefálica (THAKKAR, 2011). No cérebro, os neurônios histaminérgicos são os principais responsáveis pela produção e armazenamento da histamina neuronal. Já nos tecidos periféricos é sintetizada e armazenada majoritariamente por mastócitos, basófilos no sangue e células enterocromafins-*like* no estômago (BRUNTON et al., 2010; THAKKAR, 2011).

Os efeitos fisiológicos mais conhecidos da histamina estão relacionados com a sua ação sobre a musculatura lisa (uterina, intestinal, vascular e brônquios), estimulação da secreção de ácido gástrico, além de atuar na inflamação, cicatrização, imunomodulação, hematopoiese, diferenciação celular, neurotransmissão, entre outros (CORRÊA; FERNANDES, 2015; FENG; HOU; LI, 2013; MAHDY; WEBSTER, 2017).

Em relação as funções fisiológicas, a histamina, liberada pelas células enterocromafins-*like* no estômago, exerce importante função relacionada à atividade gástrica através da capacidade de induzir as células parietais a secretar o ácido gástrico. Além da via parácrina, as vias endócrina e neuronal também estão envolvidas na secreção gástrica por meio da liberação de gastrina e acetilcolina, respectivamente (BAROCELLI; BALLABENI, 2003; BRUNTON et al., 2010).

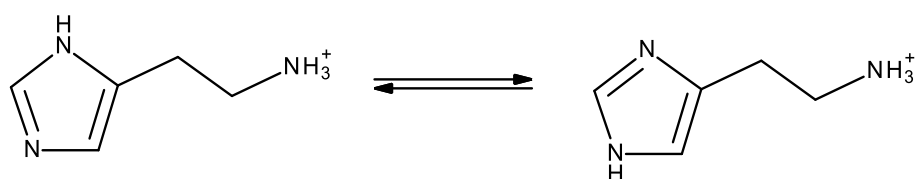
Os mastócitos e basófilos são as células hematopoiéticas que estão intimamente relacionadas com a resposta da inflamação alérgica (MAHDY; WEBSTER, 2017). Em 1878 e 1879, mastócitos e basófilos, respectivamente, e seus aspectos granulares no meio intracelular foram relatados por Paul Ehrlich e posteriormente foi comprovada a composição desses grânulos (AMIN, 2012; SIRACUSA et al., 2013). Dentre as células que compõem o sistema imunológico, os basófilos representam 1% do total e seus grânulos contém histamina (SIRACUSA et al., 2013). Já os mastócitos possuem um grande número de organelas em seu citoplasma que armazenam histamina, citocinas, proteases, assim como o ácido araquidônico e seus metabólitos (AMIN, 2012). Tanto mastócitos quanto basófilos apresentam receptores específicos em suas membranas plasmáticas onde os anticorpos do tipo E (Imunoglobulina E – IgE), produzidos por linfócitos B a partir do contato com um antígeno, ligam-se e uma porção da IgE se mantém livre para reagir com o alérgeno. Ao ocorrer esse contato desencadeia-se uma sequência de reações intracelulares, as quais culminam na exocitose de histamina e de outros mediadores (AMIN, 2012; MAHDY; WEBSTER, 2017).

O sistema histaminérgico no cérebro humano é constituído por cerca de 64.000 neurônios e está concentrado principalmente no núcleo tuberomamilar do hipotálamo (HU; CHEN, 2017; THAKKAR, 2011). Apesar de seu corpo celular estar em uma área restrita (HU; CHEN, 2017), os axônios dos neurônios produtores de histamina são estendidos por todas as partes do cérebro, abrangendo córtex cerebral, tronco cerebral e hipocampo (ELLENBROEK; GHIABI, 2014; SCHNEIDER;

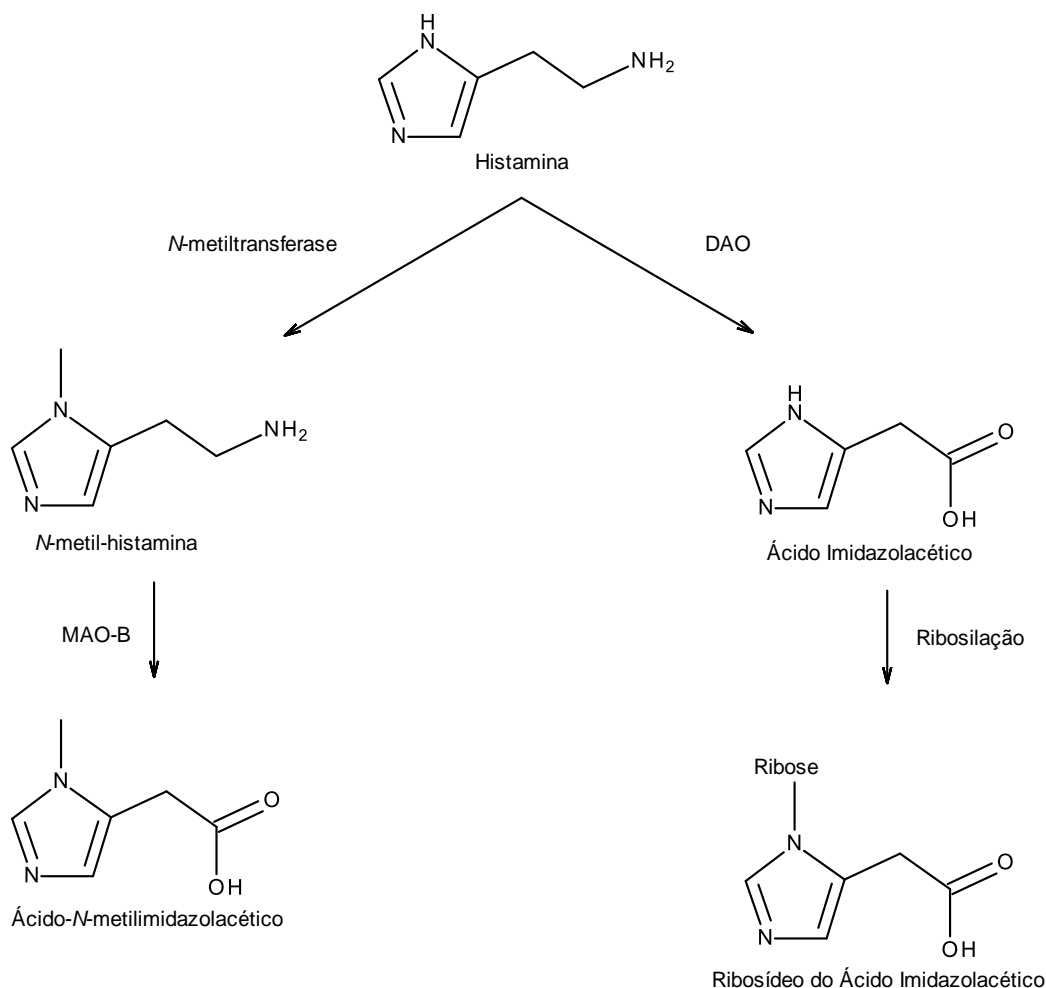
SEIFERT, 2015). Na neurotransmissão, a histamina atua em fibras nervosas histaminérgicas modulando sua própria liberação e também de outros neurotransmissores como acetilcolina, norepinefrina, dopamina e serotonina. Devido a essa interação, desempenha papel importante com relação ao estado de vigília e sono, regulação da função cognitiva, memória, homeostase endócrina e déficit de atenção e hiperatividade (BRUNTON et al., 2010; MAHDY; WEBSTER, 2017).

A síntese de histamina ocorre a partir da descarboxilação do aminoácido *L*-histidina através da enzima *L*-histidina descarboxilase. É armazenada em grânulos secretores quando produzida por mastócitos e basófilos ou liberada quando sua síntese é realizada pelas células da epiderme e por tecidos em regeneração (BRUNTON et al., 2010; MAHDY; WEBSTER, 2017). Em semelhança a outros neurotransmissores, a histamina é constituída por uma porção com a etilamina e é diferenciada pela presença de um anel imidazólico que atribui à molécula mais de um centro básico. Devido ao anel imidazólico, a histamina pode apresentar duas formas tautoméricas (figura 2) e esta particularidade é essencial para a ativação de alguns receptores. No entanto, em pH fisiológico, ambos os tautômeros estão na forma monovalente devido ao  $pK_a$  de 5,8 e 9,5 para o anel imidazólico e amina alifática, respectivamente (LEURS et al., 2012; PAIVA; TOMINAGA; PAIVA, 1970).

**Figura 2 – Tautomerismo da histamina**



A metabolização da histamina é realizada principalmente pelas enzimas *N*-metil-transferase, monoamino-oxidase B (MAO-B) e diamino-oxidase (DAO). A enzima *N*-metil-transferase metila o anel imidazólico, formando a *N*-metil-histamina que é catalisada a ácido *N*-metil-imidazolacético através da MAO. Outra via de metabolização é através da enzima DAO, cuja reação de desaminação oxidativa converte a histamina em ácido imidazolacético e a adição de uma ribose forma o ribosídeo do ácido imidazolacético (figura 3). A excreção dos metabólitos sem atividade gerados por ambas vias de metabolização ocorre principalmente através da urina (BRUNTON et al., 2010; MAHDY; WEBSTER, 2017).

**Figura 3 – Metabolismo da Histamina.**

## 2.2 Receptores

Os receptores histaminérgicos identificados como H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub> e H<sub>4</sub> são responsáveis pelos efeitos da histamina. Estes receptores são expressos na membrana celular e são categorizados como receptores acoplados a proteína G, no entanto, apresentam respostas biológicas diferentes quando ativados pelo seu mediador endógeno (AKDIS; SIMONS, 2006; MUKHERJEE; YADAV, 2016).

A atividade do receptor H<sub>1</sub> está relacionada as respostas alérgicas e inflamatórias como aumento da permeabilidade dos vasos sanguíneos, contração das vias aéreas e musculatura lisa. Já a principal resposta da ativação do receptor H<sub>2</sub> é a secreção de ácido gástrico no estômago. O receptor H<sub>3</sub> está amplamente distribuído no sistema nervoso central e periférico nas fibras nervosas pré-sinápticas, atuando como autorreceptor e o receptor H<sub>4</sub> é encontrado em células do

sistema imunológico e está relacionado com algumas doenças como dermatite atópica, asma e artrite reumatóide (CORRÊA; FERNANDES, 2015; OHSAWA; HIRASAWA, 2014).

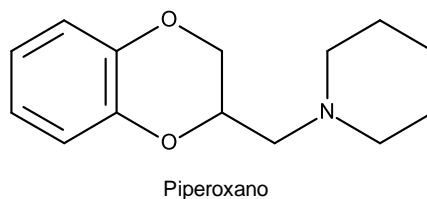
### **2.2.1 Receptor H<sub>1</sub>**

O receptor histaminérgico H<sub>1</sub> está amplamente distribuído nos tecidos periféricos como o coração, musculatura lisa, medula adrenal, nervos sensoriais, endotélio e epitélio assim como no SNC do corpo humano (MAHDY; WEBSTER, 2017; TIMMERMAN; VAN DER GOOT, 2009). Este receptor é acoplado a proteína G<sub>q/11</sub> e a fosfolipase C, que quando ativadas, excitam as células por desencadear uma série de reações dependentes de cálcio (Ca<sup>2+</sup>) (PANULA; NUUTINEN, 2013). Sua constituição dá-se por 487 aminoácidos em humanos, os quais apresentam a característica estrutural de sete domínios transmembranares (HU; CHEN, 2017; LEURS et al., 2012; TABAREAN, 2015).

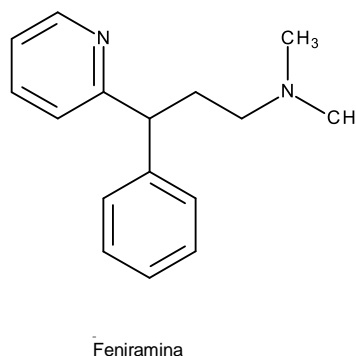
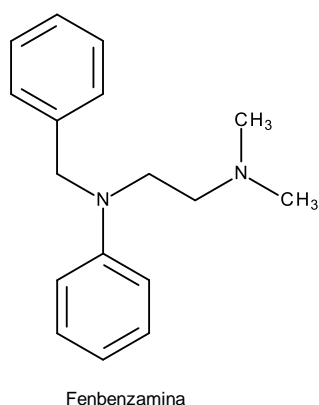
A relação entre as principais características das respostas alérgicas (aumento da permeabilidade vascular, broncoconstrição das vias aéreas, entre outras) e o receptor H<sub>1</sub> foi estabelecida e a partir de então foram desenvolvidos os agonistas inversos H<sub>1</sub> para uso como antialérgicos (TIMMERMAN; VAN DER GOOT, 2009). Entretanto, a sonolência, sedação, diminuição da capacidade cognitiva (LEMKE et al., 2012), efeitos colaterais centrais mais pronunciados que os anti-histamínicos de primeira geração apresentam (figuras 4 e 5) eram evidenciados em doses menores que a dose necessária para que de fato exercessem sua função (TIMMERMAN; VAN DER GOOT, 2009). Outros efeitos colaterais são observados devido ao bloqueio de receptores colinérgicos, sendo estes: constipação, visão embaçada, boca seca e retenção urinária e ocorrem devido a homologia em torno de 40% entre o receptor H<sub>1</sub> e receptores muscarínicos M<sub>1</sub> e M<sub>2</sub> (LEMKE et al., 2012).



**Figura 4** – Piperoxano, descoberto por Forneau e Bovet e considerado o primeiro anti-histamínico.

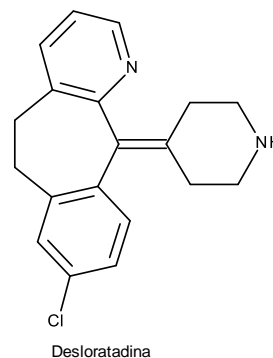
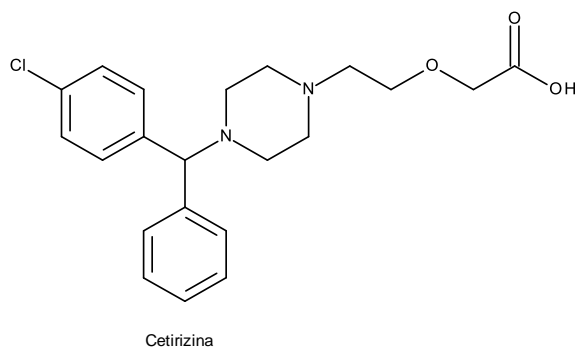


**Figura 5** – Exemplos de anti-histamínicos H<sub>1</sub> de primeira geração.



A partir de 1980, os anti-histamínicos de segunda geração (figura 6) foram introduzidos no mercado com significativa melhora na seletividade para o receptor H<sub>1</sub>, com pouco ou nenhum efeito de sedação e mínimos efeitos anticolinérgicos devido a propriedade de atravessar minimamente a barreira hematoencefálica (BRUNTON et al., 2010; LEMKE et al., 2012; TIMMERMAN; VAN DER GOOT, 2009).

**Figura 6** – Exemplos de anti-histamínicos H<sub>1</sub> de segunda geração.



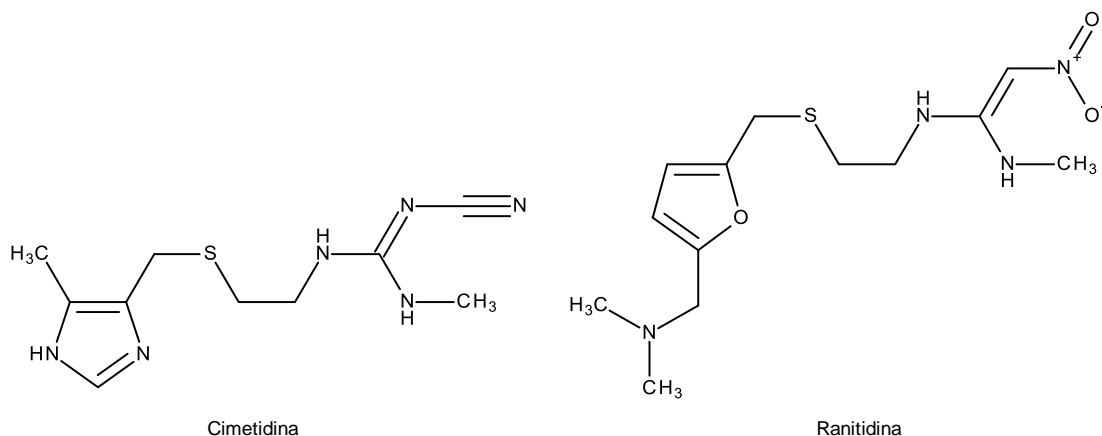
### 2.2.2 Receptor H<sub>2</sub>

Estudos relacionados com ação da histamina e os anti-histamínicos já descobertos progrediram e na década de 1960, foi constatado que os agonistas inversos disponíveis não produziam efeitos sobre a estimulação da secreção gástrica. Logo foi pressuposto que a histamina exercia ação em outro subtipo de receptor e designou-se receptor H<sub>2</sub> (MAHDY; WEBSTER, 2017). Em 1972, o receptor histaminérgico H<sub>2</sub> foi localizado em tecidos do coração, estômago e útero de cobaias durante estudos realizados por Black e colaboradores. Algumas pesquisas realizadas posteriormente indicaram a presença desse receptor também no corpo humano, nos tecidos do miocárdio e vascular (BERTACCINI; POLI; CORUZZI, 1993).

O receptor histaminérgico H<sub>2</sub> é constituído por 359 aminoácidos e acoplado a proteína G, entretanto, ao subtipo G<sub>s</sub> que estimula a adenilciclase e a proteína quinase A (PKA) (HU; CHEN, 2017; LEMKE et al., 2012; PANULA; NUUTINEN, 2013). A homologia entre os receptores H<sub>1</sub> e H<sub>2</sub> é de cerca de 40% (LEURS et al., 2012), entretanto, está distribuído nos tecidos de forma mais limitada quando comparado com o receptor H<sub>1</sub>. É encontrado nos tecidos do miocárdio, vascular, células parietais e cerebral (CORRÊA; FERNANDES, 2015; HU; CHEN, 2017).

A principal função dos agonistas inversos (figura 7) do receptor H<sub>2</sub> na clínica é na redução da secreção de ácido gástrico, sendo muito útil no tratamento de úlceras gástricas e duodenal e também no refluxo gastroesofágico (CORRÊA; FERNANDES, 2015; TIMMERMAN; VAN DER GOOT, 2009).

**Figura 7** – Exemplos de anti-histamínicos H<sub>2</sub>.



### 2.2.3 Receptor H<sub>3</sub>

O receptor histaminérgico H<sub>3</sub> foi identificado em 1983, por Arrang e colaboradores, durante estudos realizados no córtex cerebral de ratos. De acordo com os resultados obtidos em seus experimentos farmacológicos, identificaram e nomearam como receptor H<sub>3</sub> o novo receptor de histamina que regulava a autoinibição da liberação da histamina no cérebro (ARRANG; GARBARG; SCHWARTZ, 1983). Atualmente sabe-se que o receptor H<sub>3</sub> é um auto e heterorreceptor pré-sináptico que regula também a liberação de outros neurotransmissores tal como acetilcolina, dopamina, ácido-γ-aminobutírico (GABA), norepinefrina, serotonina e peptídeos e não somente de histamina (BRUNTON et al., 2010; LEMKE et al., 2012; PASSANI; BLANDINA, 2011; TIMMERMAN; VAN DER GOOT, 2009). Além da localização pré-sináptica, há estudos que sugerem a presença do receptor H<sub>3</sub> pós-sináptico os quais podem estar envolvidos na modulação de dopamina no estriado (PANULA; NUUTINEN, 2013).

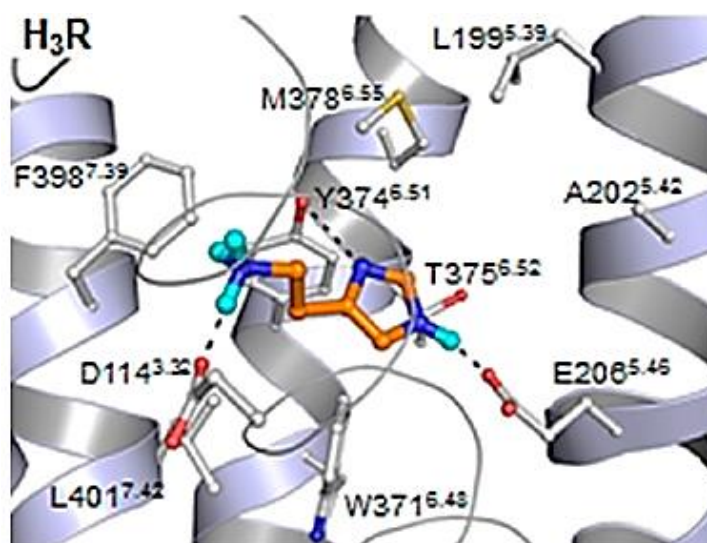
A estrutura do receptor H<sub>3</sub> foi demonstrada cerca de dez anos após sua identificação através da clonagem do receptor realizada por Lovenberg e colaboradores (LOVENBERG et al., 1999) e a partir desses estudos, foram identificadas também outras isoformas deste receptor (PASSANI; BLANDINA, 2011; SADEK et al., 2016). É constituído por 445 aminoácidos e considerado um receptor acoplado à proteína G do subtipo G<sub>ai/o</sub> que regula negativamente a adenilato ciclase (LEURS et al., 2012). Assim como os demais receptores que pertencem à família dos receptores acoplados à proteína G (GPCRs), sua estrutura é constituída por sete domínios transmembranares apresentando três alças intra e três alças extracelulares, com terminal carboxila intracelular e o terminal amino extracelular (NIETO-ALAMILLA et al., 2016).

A ativação do receptor H<sub>3</sub> pela histamina, reduz a formação de monofosfato cíclico de adenosina (AMPc) e assim não estimula a PKA. A sinalização celular também ocorre por ativação de outras enzimas abrangendo a fosfolipase A2, fosfoinositol-3-quinase (PI3K) e quinase ativada por mitógeno (PANULA; NUUTINEN, 2013). Outra sinalização celular resultante da ativação do receptor H<sub>3</sub> é a ativação dos canais iônicos e aumento da mobilização de cálcio (THURMOND; GELFAND; DUNFORD, 2008).

Em comparação aos receptores histaminérgicos humanos H<sub>1</sub> e H<sub>2</sub>, o receptor H<sub>3</sub> apresenta baixa homologia, 22% e 21,4% respectivamente. Dentre as isoformas que são expressas por diversas espécies, a homologia entre os receptores é alta, de no mínimo 93% e apresenta também de 20% a 27% de homologia com outros receptores de aminas endógenas (LOVENBERG et al., 1999). No SNC, o receptor H<sub>3</sub> é expresso predominantemente no cérebro, em especial nos gânglios da base, corpo estriado, substância negra, hipocampo e córtex e há expressão minoritária em tecidos periféricos como o trato gastrointestinal, vasos sanguíneos e vias aéreas (LEMKE et al., 2012; TIMMERMAN; VAN DER GOOT, 2009).

A presença do resíduo aspartato (Asp114<sup>3.32</sup>) conservado no domínio transmembranar 3 é comum para todos os receptores de aminas biogênicas, o qual demonstra estar envolvido na interação com a amina presente na cadeia lateral da etilamina da histamina, por estar carregado negativamente. Um modelo de homologia para o receptor H<sub>3</sub> indica a importância da ligação de hidrogênio que o anel imidazólico doa ao Glu206<sup>5.46</sup> no domínio transmembranar 5. Além dos resíduos citados anteriormente, a presença de outros resíduos como triptofano 196 (Trp196), treonina 201 (Thr201), alanina 202 (Ala202), treonina 204 (Thr204) e fenilalanina 208 (Phe208) no domínio transmembranar 5 são significativos para a interação hidrofóbica com a histamina. O resíduo de glutamato (Glu206<sup>5.46</sup>) presente apenas nos receptores H<sub>3</sub> e H<sub>4</sub> pode realizar ligações mais fortes com *N*<sup>+</sup>-nitrogênio da histamina, o que possivelmente explica a maior afinidade desta por estes receptores, uma vez que nos receptores H<sub>1</sub> e H<sub>2</sub> nesta mesma posição, há a presença dos resíduos asparagina (Asn) e treonina (Thr). A estrutura farmacofórica proposta é que o Glu206<sup>5.46</sup> ancora a porção imidazólica da histamina, os demais resíduos constituem um leito lipofílico para o assentamento da histamina e assim a interação da porção amina da histamina com o Asp114 é beneficiada (figura 8) (KISS; KESERÚ, 2016; NIETO-ALAMILLA et al., 2016; PANULA et al., 2015).

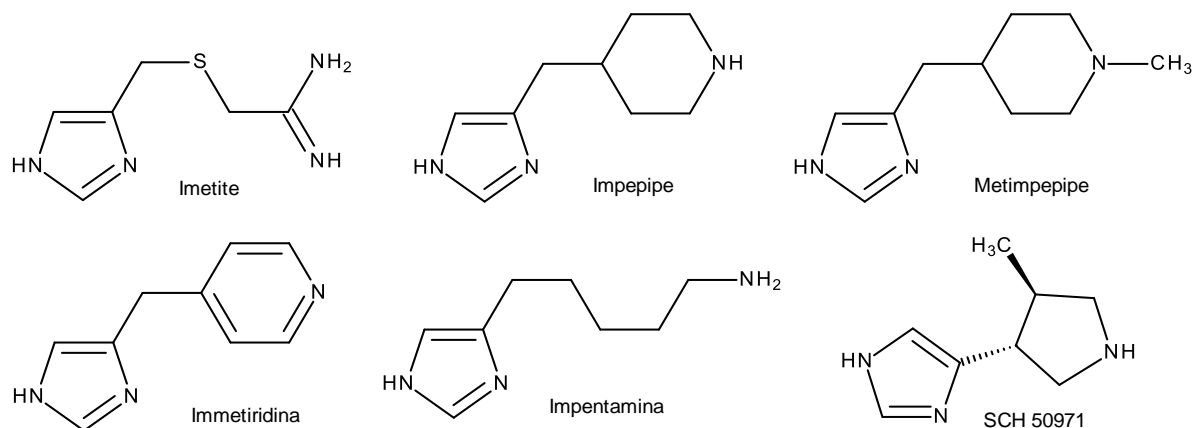
**Figura 8** – Interação da histamina com os resíduos de aminoácidos do receptor H<sub>3</sub>.



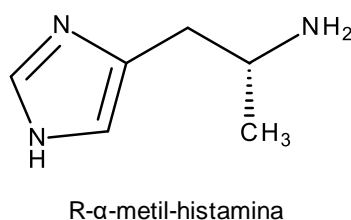
Fonte: Reproduzido com permissão de PANULA *et al.* 2015. Protegido por direitos autorais . The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics.

Após a descoberta do receptor H<sub>3</sub> e da importância do seu papel no sistema nervoso central em regular a liberação de histamina e de outros neurotransmissores, este receptor tornou-se um alvo promissor. Este receptor pode ser útil para tratamento de diversas doenças como distúrbios neuronais e psiquiátricos relacionados ao sono e vigília, memória, cognição, transtorno do déficit de atenção e hiperatividade, doença de Alzheimer e de Parkinson, entre outras, uma vez que a abordagem terapêutica que apresenta ação múltipla pode aumentar o êxito no tratamento (LEURS *et al.*, 2012; NAKAMURA *et al.*, 2000; NIETO-ALAMILLA *et al.*, 2016).

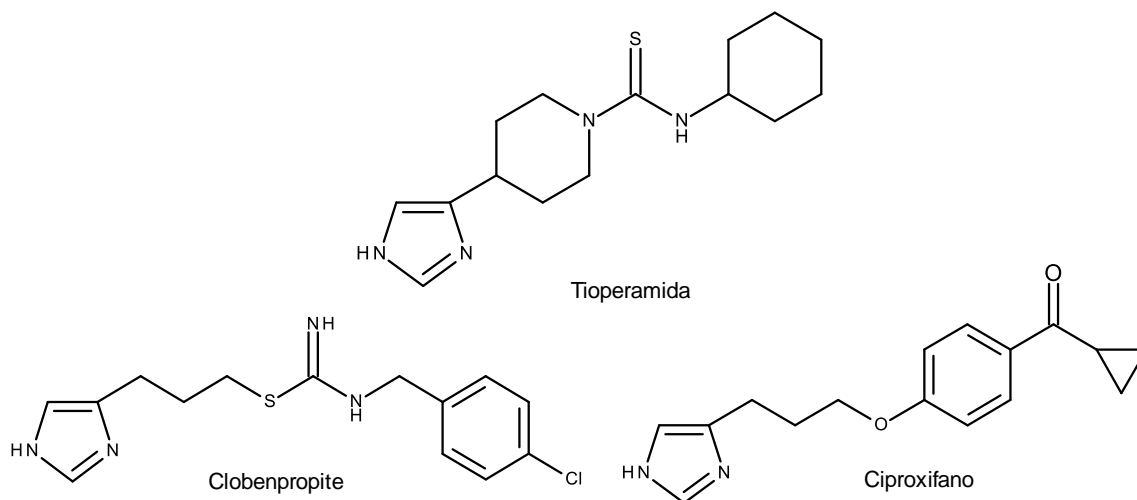
A principal característica dos ligantes com atividade agonista para H<sub>3</sub>R é a presença do anel imidazólico na sua estrutura, sendo estes considerados portanto, análogos da histamina. A atividade agonista deste grupo de ligantes (Figura 9) é aumentada com a inserção de um ou dois grupos metileno na cadeia lateral da histamina (WALTER; STARK, 2012).

**Figura 9** – Ligantes agonistas imidazólicos do receptor H<sub>3</sub>.

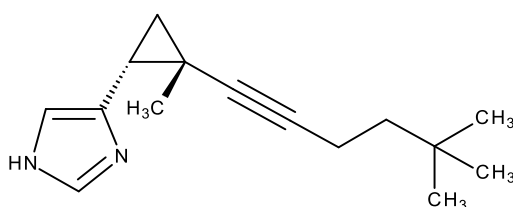
A *R*- $\alpha$ -metil-histamina (figura 10) foi o primeiro ligante com alta atividade agonista seletiva ( $pK_i = 5,2$ ) (TILIGADA et al., 2009) identificada para o receptor H<sub>3</sub> por apresentar baixa afinidade pelos receptores H<sub>1</sub> e H<sub>2</sub>. A estereosseletividade do receptor H<sub>3</sub> devido à baixa afinidade apresentada pelo enantiômero *S*, foi de extrema importância para sua caracterização (TIMMERMAN; VAN DER GOOT, 2009; VAN DER GOOT; TIMMERMAN, 2000).

**Figura 10** – Primeiro ligante agonista do receptor H<sub>3</sub>.

Em 1987, Schwartz e colaboradores identificaram a tioperamida (figura 11) com atividade antagonista para o receptor H<sub>3</sub> ( $pK_i = 7,2$ ) (TILIGADA et al., 2009). Diversos antagonistas análogos da tioperamida e de agonistas do receptor H<sub>3</sub> (imetite e impentamina) foram sintetizados (figura 11) (NIETO-ALAMILLA et al., 2016; PARSONS; GANELLIN, 2006).

**Figura 11** – Antagonistas imidazólicos do receptor H<sub>3</sub>.

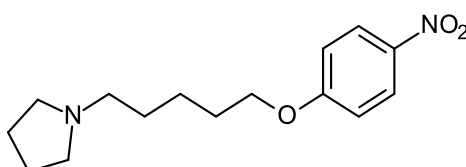
O GT-2331 (cipralisanto) (figura 12), foi o primeiro composto que teve estudos clínicos realizados até a fase II para tratamento do transtorno do déficit de atenção e hiperatividade (MARSON, 2011; SCHWARTZ, 2011), no entanto, a atividade antagonista esperada não foi evidenciada, pois mostrou-se ser um agonista parcial, propriedade esta divulgada posteriormente (SCHWARTZ, 2011).

**Figura 12** – Antagonista do receptor H<sub>3</sub> GT-2331.

Entretanto, os compostos citados anteriormente (agonistas, tioperamida e seus análogos) não foram promissores por apresentarem algumas importantes características farmacocinéticas que restringiram a continuidade dos estudos, sendo a limitação na permeação da barreira hematoencefálica, inibição das enzimas do citocromo P<sub>450</sub> (CYP450) por conterem em suas estruturas o anel imidazólico, surgimento de reações adversas e falta de seletividade para este receptor, atuando também no receptor H<sub>4</sub> (PARSONS; GANELLIN, 2006; SZCZEPAŃSKA; KUDER; KIEĆ-KONONOWICZ, 2018; TIMMERMAN; VAN DER GOOT, 2009).

Devido às interações já citadas dos derivados imidazólicos, avançaram a busca de novas classes de compostos e a partir de então, novas moléculas com atividade antagonista / agonista inversa não imidazólicos foram planejadas e o primeiro estudo de relação estrutura-atividade (REA) para antagonistas não imidazólicos revelou o composto UCL-1972 ( $K_i = 39$  nM para o receptor  $H_3$  de rato) (figura 13), onde houve a substituição do anel imidazólico por uma pirrolidina. Há relatos também na literatura onde a porção imidazólica foi substituída por outros heterociclos alifáticos como pirrolidina, 2-aminopirrolidina e piperazinas (NIETO-ALAMILLA et al., 2016; PANULA et al., 2015; SANDER; KOTTKE; STARK, 2008).

**Figura 13 – UCL-1972.**



O modelo farmacofórico proposto para antagonistas não-imidazólicos para receptor  $H_3$  é composto por uma amina básica terciária ligado a um núcleo central aromático através de um espaçador alifático (formado por uma cadeia linear geralmente propiloxi ou que seja estruturalmente restrita) e uma porção que pode conter grupos ácido, básico, polares ou resíduo lipofílico (figura 14) (CELANIRE et al., 2005; SZCZEPAŃSKA; KUDER; KIEĆ-KONONOWICZ, 2018).

**Figura 14 – Modelo farmacofórico proposto para antagonistas  $H_3$  não-imidazólicos.**



Fonte: Farmacóforo proposto (adaptado de SZCZEPAŃSKA; KUDER; KIEĆ-KONONOWICZ, 2018).

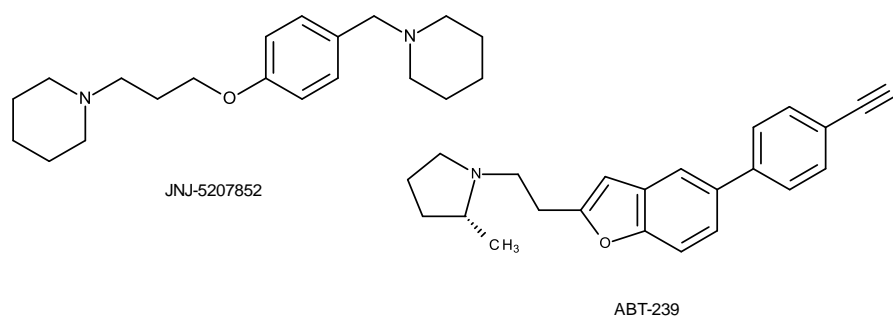
Diante disso, alterações em suas duas principais estruturas básicas e no comprimento do espaçador resulta em variadas classes de possíveis ligantes, como as diaminas (SANDER; KOTTKE; STARK, 2008). O composto JNJ-5207852



(figura 15) ( $K_i = 0,6$  nM para o receptor  $H_3$  humano) (PANULA et al., 2015) é uma dipiperidina que tornou-se um candidato a estudos pré-clínicos para tratamento de doenças relacionadas com a cognição. A presença da segunda amina básica nessa estrutura confere maior afinidade ao receptor, indicando que a interação com o Glu206 é favorecida, entretanto, o acúmulo no tecido cerebral, sua prolongada interação com o receptor e a iminência de causar fosfolipidose resultaram na descontinuação dos estudos (SANDER; KOTTKE; STARK, 2008).

O ligante ABT-239 (figura 15) ( $K_i = 0,45$  nM para o receptor  $H_3$  humano) (PANULA et al., 2015), pertencente a classe dos benzofuranos, apresentou alta eficácia *in vivo* quando aplicado em modelos animais para doença de Alzheimer, déficit de atenção e esquizofrenia (PANULA et al., 2015). A pesquisa, no entanto, foi interrompida para este composto promissor por apresentar inibição da *human ether-a-go-go related gene - hERG* (canal iônico de potássio cardíaco humano) (SANDER; KOTTKE; STARK, 2008), culminando em arritmia e por conferir a fosfolipidose (WALTER; STARK, 2012). Na literatura é sugerido que o oxigênio presente nos compostos dessa classe interagem com o resíduo Trp189<sup>(5.29)</sup> (KISS; KESERÜ, 2016).

**Figura 15** – Compostos JNJ-5207852 e ABT-239 antagonistas não-imidazólicos do receptor  $H_3$ .

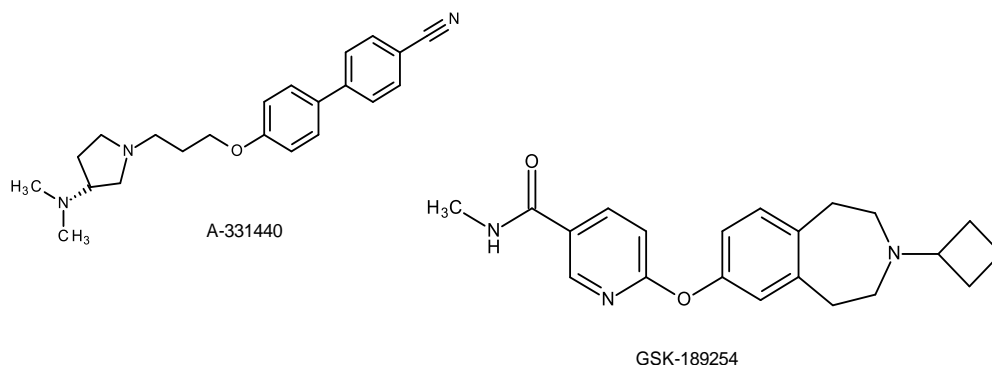


A molécula A-331440 (figura 16) ( $K_i = 3,24$  nM para o receptor  $H_3$  humano clonado) (HANCOCK et al., 2004) é um antagonista potente e seletivo para receptor  $H_3$  que mostrou-se eficaz no tratamento da obesidade, diminuindo a gordura corporal e resistência à insulina, sem nenhuma ação no campo da cognição, entretanto a genotoxicidade induzida pelo ligante resultou na descontinuação da sua aplicação (HANCOCK et al., 2004; SANDER; KOTTKE; STARK, 2008).

O composto GSK-189254 (figura 16) ( $K_i = 0,1$  nM para o receptor  $H_3$  humano) (PANULA et al., 2015) apresentou efeitos benéficos em modelos animais para

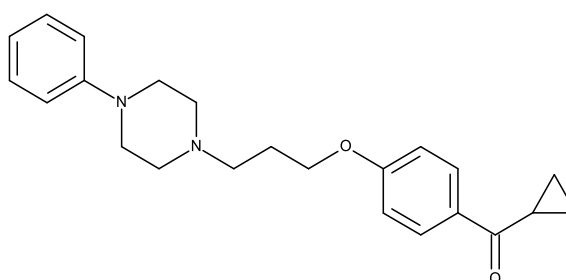
memória, atenção, narcolepsia e sobre a dor neuropática (SANDER; KOTTKE; STARK, 2008; WALTER; STARK, 2012).

**Figura 16** – Compostos A-331440 e GSK-189254 antagonistas não-imidazólicos do receptor H<sub>3</sub>.



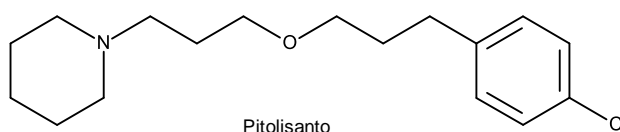
Composto nos quais a porção imidazólica foi substituída por piperazinas foram explorados no planejamento racional de fármacos, especialmente na busca de ligantes para as GPCRs. A busca por compostos que possuam perfis farmacocinéticos e farmacodinâmicos apropriados a clínica são essenciais para moléculas candidatas a novos fármacos e, neste contexto, as piperazinas conferem expressiva melhora a esses parâmetros em virtude de suas propriedades físico-químicas. A piperazina adicionada a esses compostos promovem a melhora de características farmacocinéticas, como solubilidade em água devido  $pK_a$  que os átomos de nitrogênio que compõe a molécula conferem a estrutura (SZCZEPAŃSKA et al., 2018). O DL-80 ( $K_i = 111$  nM para o receptor H<sub>3</sub> humano) (figura 17) é um exemplo de composto planejado com uma *N*-arilpiperazina que ilustra essa classe (SZCZEPAŃSKA; KUDER; KIEĆ-KONONOWICZ, 2018).

**Figura 17** – DL-80.



Baseado também nessa classe de compostos não-imidazólicos, o pitolisanto ( $K_i = 0,3-5,3$  nM) (conhecido inicialmente por BF2.649 e designado tiprolisanto pela Organização Mundial da Saúde) (figura 18), um antagonista contendo o núcleo piperidina *N*-substituído foi aprovado e liberado para comercialização pela agência europeia em março de 2016 sob a marca Wakix® para tratamento da narcolepsia com ou sem cataplexia em adultos (KOLLB-SIELECKA et al., 2017; SCHWARTZ, 2011; SZCZEPAŃSKA; KUDER; KIEĆ-KONONOWICZ, 2018).

**Figura 18 – Pitolisanto.**



#### 2.2.4 Receptor H<sub>4</sub>

O receptor H<sub>4</sub> foi descoberto e identificado por Tamaki Oda e colaboradores através da sequência genética do receptor H<sub>3</sub> aproximadamente no ano 2000 (TIMMERMAN; VAN DER GOOT, 2009). Ainda nos primeiros anos do século XXI, diversos grupos de pesquisa relataram na literatura a clonagem deste novo receptor (MARSON, 2011).

O quarto receptor histaminérgico é majoritariamente encontrado em células que originam-se do sistema hematopoiético tais como mastócitos, eosinófilos, leucócitos, basófilos, monócitos, células dendríticas, baço, medula óssea, entre outros (MARSON, 2011). Pesquisas recentes demonstraram também sua presença no SNC, neurônios sensoriais, células que constituem o tecido cutâneo, pulmão, intestino, células cancerígenas, tecido sinovial e cartilagem (CORRÊA; FERNANDES, 2015; HU; CHEN, 2017; OHSAWA; HIRASAWA, 2014; YAMAURA et al., 2013). Estão diretamente relacionados com as respostas fisiológicas inflamatórias e alérgicas mediadas por histamina, abrangendo o controle de liberação de citocinas e quimiocinas e recrutamento celular devido à sua presença em células do sistema imunológico (LIU, 2014; YAMAURA et al., 2013).

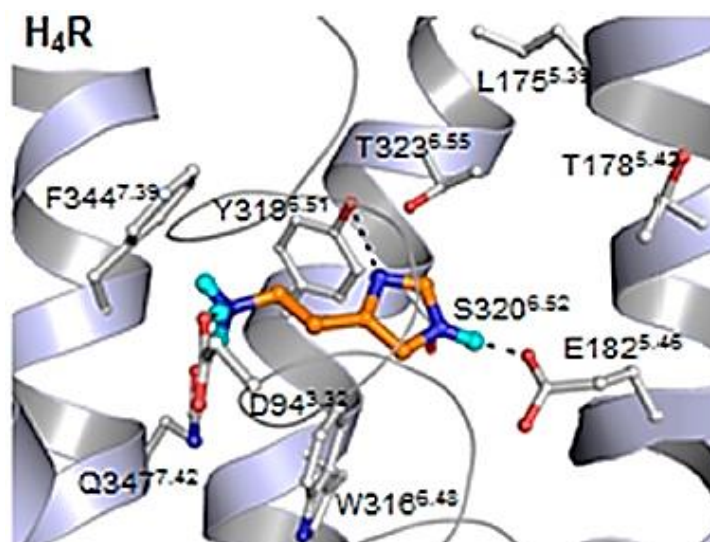
O receptor H<sub>4</sub>, semelhantemente aos demais receptores histaminérgicos, apresenta sete domínios transmembranares, é classificado como um receptor acoplado à proteína G classe A e constituído por 390 aminoácidos (MARSON,

2011), apresentando o resíduo aspartato (Asp94) e de glutamato (Glu182) nos domínios transmembranares 3 e 5, respectivamente (WALTER; STARK, 2012). Apresenta baixa homologia com os receptores H<sub>1</sub> e H<sub>2</sub>, aproximadamente 20% (THURMOND, 2015) e entre 35 a 48% na sequência de aminoácidos com o receptor H<sub>3</sub> (ZHANG; THURMOND; DUNFORD, 2007). O quarto receptor histaminérgico apresenta três isoformas, sendo estas *hH4R<sub>67</sub>*, *hH4R<sub>302</sub>* e *hH4R<sub>390</sub>* (TILIGADA et al., 2009).

É acoplado a proteína G<sub>ai/o</sub> e ao ser ativado pela histamina, a sinalização celular resulta na diminuição da formação do AMPc, na ativação da proteína quinase ativada por mitógeno e aumento da mobilização de Ca<sup>2+</sup> (OHSAWA; HIRASAWA, 2014).

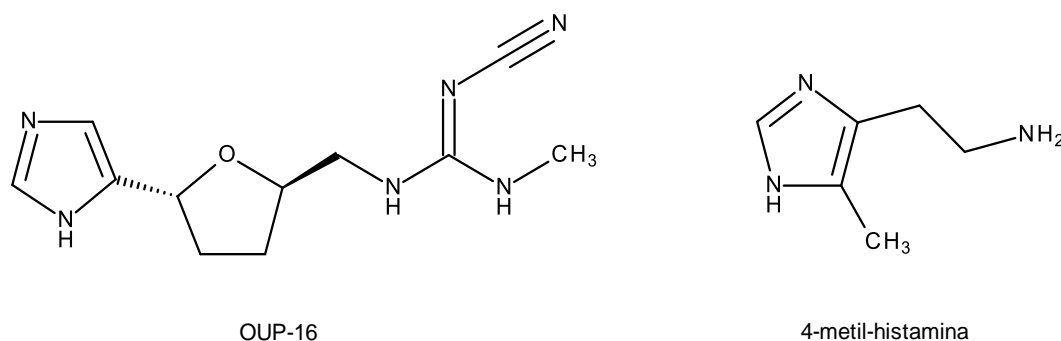
Como citado anteriormente, a presença do resíduo de aspartato no domínio transmembranar 3 é característico as aminas biogênicas. No receptor H<sub>4</sub>, o resíduo Asp94<sup>(3.32)</sup> é crucial para interação com a amina protonada presente na cadeia etilamina, assim como a presença do resíduo Glu182<sup>(5.46)</sup> no domínio transmembranar 5 para a interação com o anel imidazólico (PANULA et al., 2015), entretanto é sugerido por Kiss e Keserű (2016) que a porção protonada da histamina possa interagir com este resíduo. Este demonstra também ter importância também na interação com outros ligantes agonistas menores (PANULA et al., 2015). Os resíduos cisteína (Cys) presentes no receptor H<sub>4</sub> possivelmente formam pontes de sulfeto que ligam o domínio transmembranar 3 e a segunda alça extracelular, indicando ser de extrema importância para a interação com a histamina (figura 19) (WALTER; STARK, 2012).

**Figura 19** – Interação da histamina com os resíduos de aminoácidos do receptor H<sub>4</sub>.



Fonte: Reproduzido com permissão de PANULA *et al.* 2015. Protegido por direitos autorais . The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics.

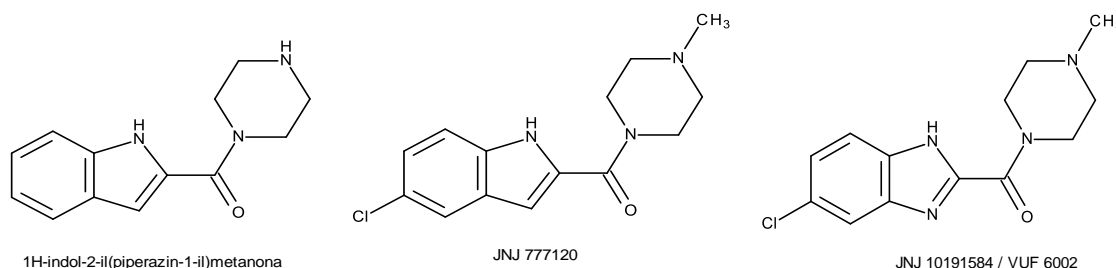
Devido à alta homologia com o terceiro receptor histaminérgico, muitos ligantes H<sub>3</sub> apresentam afinidade pelo receptor H<sub>4</sub>, como os agonistas *R*- $\alpha$ -metil-histamina ( $pK_i = 7,3$ ) (figura 10) (THURMOND, 2015; TILIGADA *et al.*, 2009), imetite (figura 9), imepipe (figura 9), clobenpropite (figura 11) (WALTER; STARK, 2012) e o antagonista para o receptor H<sub>3</sub> tioperamida (figura 11) que provou ser um agonista inverso potente para o receptor H<sub>4</sub> (WALTER; STARK, 2012) e, logo, não foram compostos escolhidos para diferenciar os receptores (THURMOND, 2015; TILIGADA *et al.*, 2009). O agonista OUP-16 ( $K_i = 125$  nM) (figura 20), pertencente a classe dos tetraidrofuranilimidazóis substituídos foi um dos primeiros ligantes a demonstrar relativa afinidade para o quarto receptor histaminérgico e a 4-metil-histamina ( $K_i = 50$  nM) (figura 20) é o agonista mais seletivo descrito para receptor H<sub>4</sub> (PANULA *et al.*, 2015).

**Figura 20** – Agonistas do receptor H<sub>4</sub>.

Ligantes com atividades antagonistas ou agonistas inversos para o receptor H<sub>4</sub> podem ocupar lugar de destaque na terapêutica, sendo aplicados para o tratamento de doenças imunológicas e inflamatórias onde haja atuação das células de origem hematopoiéticas (CORRÊA; FERNANDES, 2018).

Portanto, foram realizadas pesquisas com a técnica de *high-throughput screening* (HTS) no intuito de identificar compostos que seriam ligantes para o receptor H<sub>4</sub> e o resultado apresentou o Composto 1 (1H-indol-2-il(piperazin-1-il)metanona) ( $K_i = 38$  nM) (figura 21) pertencente a classe das indolcarboxamidas. Partindo-se da estrutura do Composto 1, foi identificado o primeiro ligante com alta seletividade para o receptor H<sub>4</sub> com atividade antagonista, denominado JNJ 7777120 (figura 20), com  $K_i = 4,5$  nM para o receptor H<sub>4</sub> humano e seletividade superior para este receptor frente aos demais receptores de histamina. Tornou-se o composto apropriado para entender a atividade deste novo receptor em células *in vitro* e em experimentos com animais (JABLONOWSKI et al., 2003), entretanto seu uso clínico foi descontinuado por apresentar curta meia-vida *in vivo*, por sofrer desmetilação na piperazina e pela notória toxicidade que desencadeou hipoadrenocorticismismo em ratos e cães (THURMOND et al., 2017).

Um análogo do composto JNJ 7777120 que apresenta a substituição do grupo indol por benzimidazol é o JNJ 10191584 (ou VUF-6002) (figura 21) e este também se mostrou um antagonista promissor ( $K_i = 27$  nM) para o receptor H<sub>4</sub> (ZHANG; THURMOND; DUNFORD, 2007), porém de forma semelhante ao JNJ 7777120, apresentou potencial de hipoadrenocorticismismo (THURMOND et al., 2017).

**Figura 21** – Ligantes do receptor H<sub>4</sub>: indolcarboxamida e benzimidazólico.

No intuito de explorar as indolcarboxamidas quantos aos substituintes e avaliar a influência destes na afinidade pelo receptor H<sub>4</sub>, Jablonowski *et al.* (2003) realizaram diversas alterações estruturais na porção piperazínica e na carbonila primeiramente seguidas de modificações no anel aromático do núcleo indólico e alquilação no nitrogênio indólico após a conclusão das substituições iniciais. Os *N*-substituintes na porção piperazínica comprovaram que o substituinte *N*-metil resultou no aumento na afinidade e substituintes maiores (*N*-etil e *N*-feniletil) acometem de forma expressiva a afinidade. A carbonila indica ser relevante para contribuir com o incremento da afinidade nesta classe de compostos. Os substituintes no anel aromático apresentaram resultados de afinidade com grande variação e indicaram que substituintes (Cl, Br, F, NH<sub>2</sub>, OH) na posição 5 são bem aceitos, com exceção da metoxila (OCH<sub>3</sub>) e a inserção de um grupo metila no nitrogênio indólico demonstrou ser prejudicial a afinidade.

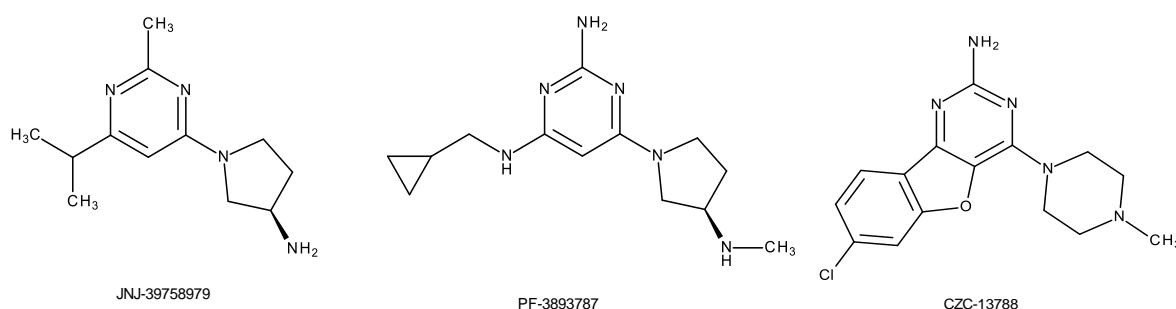
Outros sistemas heteroaromáticos bioisósteros das indolcarboxamidas como os tienopirróis e benzimidazóis mostraram-se séries promissoras de ligantes de receptores H<sub>4</sub> (VENABLE *et al.*, 2005), ao passo que outras modificações no núcleo heteroaril originando compostos benzotiofenos e benzofuranos destacam-se pela diminuição acentuada da afinidade de aproximadamente 100 vezes pelo mesmo receptor demonstrando, assim, a importância do nitrogênio no núcleo indólico como doador de ligação de hidrogênio (ENGELHARDT *et al.*, 2012).

Outras duas classes de compostos ligantes com atividade antagonista / agonista inverso para este receptor são 2-aminopirimidina e seus análogos e diidrobenzofuranilpiperazinas. Alguns ligantes importantes estão na figura 22, representando cada classe e se destacam por apresentarem estudos pré-clínicos e / ou clínicos (CORRÊA; FERNANDES, 2018).

Os compostos pertencentes a classe dos 2-aminopirimidina e seus análogos representados na figura 22 exibiram efeitos importantes. O composto JNJ-39758979

( $K_i = 12,5 \pm 2,6$  nM) (THURMOND et al., 2014) é um antagonista seletivo e potente do receptor  $H_4$  e em fase de estudos pré-clínicos comprovou segurança toxicológica em ratos e macacos. Em estudo duplo-cego, houve observação da diminuição do prurido induzido por histamina após administração oral em dose única. PF-3893787 ( $K_i = 7,99 \pm 0,08$  nM) (ANDALOUSSI et al., 2013) demonstrou resultados promissores para o tratamento da dermatite atópica em estudos de fase I já finalizados (PANULA et al., 2015) e o CZC-13788 ( $K_i = 0,17$  nM) foi eficaz no tratamento da asma e rinite alérgica em dose única ao dia, comprovando também sua potência e segurança toxicológica (CORRÊA; FERNANDES, 2018).

**Figura 22** – Ligantes do receptor  $H_4$ : análogos da 2-aminopirimidina e diidrobenzofuranilpiperazina.



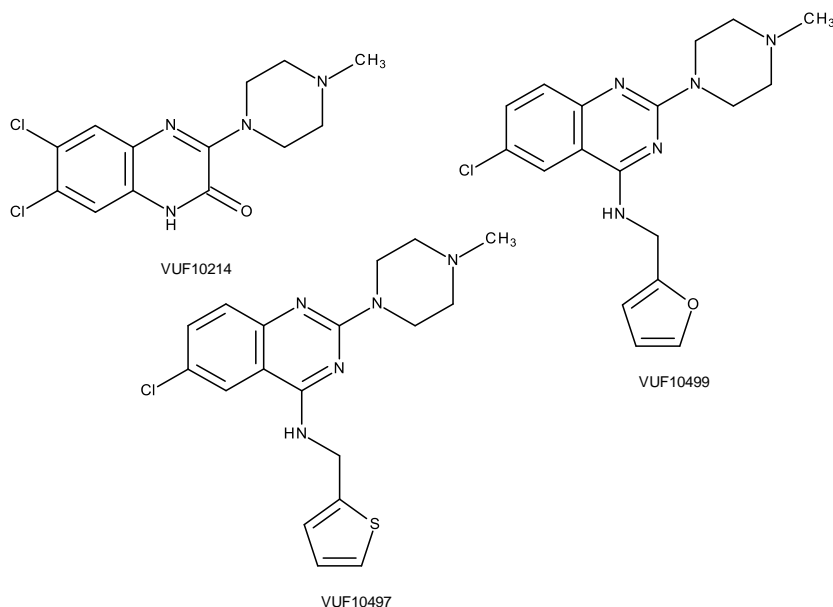
Algumas moléculas pertencentes as 2-aminopirimidinas, que possuem o grupo metilpiperazínico básico foram avaliadas quanto a substituição deste grupo por outra porção 2-aminopirimidina ligadas por um espaçante adequado. As afinidades destes novos compostos pelo receptor  $H_4$  foram semelhantes aos compostos que possuem a metilpiperazina, com a vantagem de melhorar as propriedades metabólicas, uma vez que a metilpiperazina é rapidamente metabolizada e diminui a meia-vida dos ligantes (ENGELHARDT et al., 2013). Assim é possível concluir que a presença da metilpiperazina não é essencial a afinidade com o receptor  $H_4$ .

Da classe das quinoxalinas, o VUF10214 ( $pK_i = 8,25$ ) e os compostos VUF10499 ( $pK_i = 7,57$ ) e VUF10497 ( $pK_i = 8,12$ ) (SMITS et al., 2008), análogos de quinazolininas (figura 23), reduziram o edema da pata de ratos de forma efetiva. São compostos potentes e demonstram alta afinidade pelo quarto receptor histaminérgico, sendo os dois últimos compostos mencionados agonistas inversos altamente potentes. O composto VUF10497, mostrou atividade anti-inflamatória em edema de pata após duas horas da administração mantendo a atividade por quatro



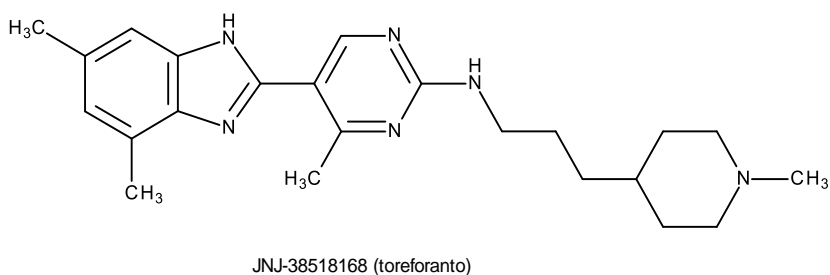
horas. Ambos compostos da classe das quinazolininas apresentaram afinidade relevante também para o receptor H<sub>1</sub> e são promissores por possuírem ação combinada (POZZOLI et al., 2009; SMITS et al., 2008).

**Figura 23** – Ligantes do receptor H<sub>4</sub> das classes quinazolininas e quinoxalinas.



Alguns outros compostos da classe benzimidazolpirimidina demonstraram atividade antagonista no receptor H<sub>4</sub> e um exemplo é o toreforanto (JNJ-38518168 -  $K_i = 8,4$  nM) (figura 24) (THURMOND et al., 2017) que prosseguiu até a fase II de estudos clínicos para tratamento de asma e artrite reumatoide, entretanto, o resultado obtido não apresentou diferenças entre o grupo tratado com o composto testado comparado com o grupo tratado com placebo (KOLLMEIER et al., 2018).

**Figura 24** – Ligante do receptor H<sub>4</sub> da classe benzimidazolpirimidina.



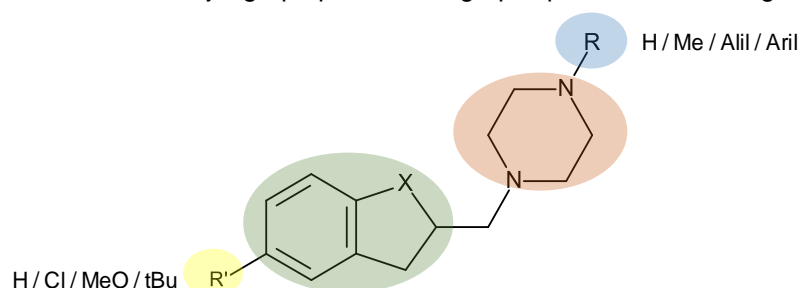
## 2.3 Estado da arte no grupo

Há alguns anos o nosso grupo de pesquisa tem direcionado esforços na busca de moléculas bioativas com afinidade pelos receptores H<sub>3</sub> e H<sub>4</sub> e tem encontrado resultados promissores. Compostos benzodihidro-heterocíclicos contendo o grupo básico piperazínico denominada série LINS 01 (figura 25) são estruturalmente similares a compostos já publicados (ABT-239 – figura 15 e JNJ 7777120 – figura 21) que apresentaram afinidade aos receptores alvo. Primordialmente, esta série almeja investigar a importância da aromaticidade do heterociclo através da presença de núcleos benzodihidrofurânicos, benzodihidroindólicos e retroisómero benzofurânico e a ausência da carbonila, presente no protótipo JNJ 7777120.

Este arcabouço era inédito até esses relatos na literatura e diversos substituintes em diferentes sítios desse arcabouço foram explorados para a compreensão da REA.

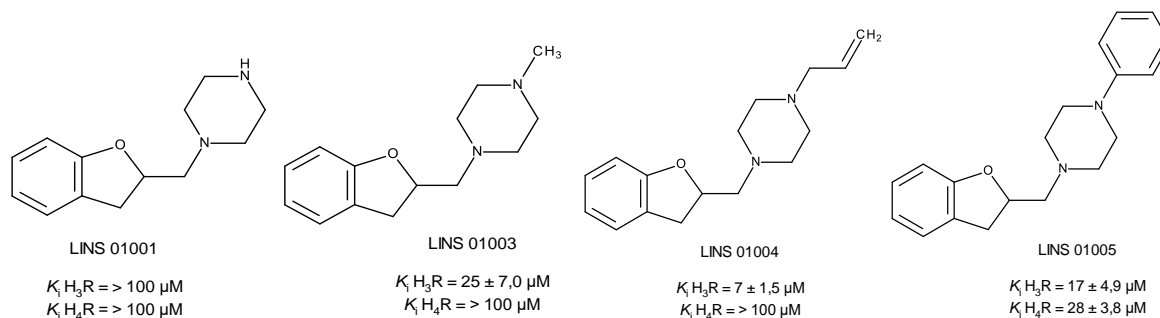
**Figura 25** – Arcabouço da série LINS e os substituintes já avaliados.

Verde: grupo heteroaril; Laranja: grupo polar; Azul: grupo lipofílico; Amarelo: grupo volumoso.



A avaliação dos *N*-substituintes na porção piperazínica terminal do arcabouço (R) foi explorada por Corrêa (2015) em sua dissertação de mestrado, originando os compostos exibidos na figura 26.

**Figura 26** – Compostos *N*-piperazínicos substituídos da série LINS 01 e resultados de  $K_i$  iniciais.



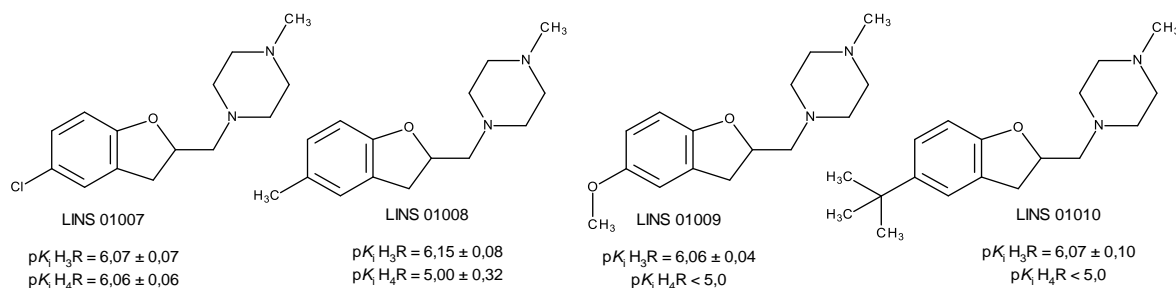
O teste de *binding*, realizado preliminarmente com a finalidade de uma triagem inicial para os ligantes acima demonstrou que as afinidades foram baixas, na concentração de micro molar para os receptores  $H_3$  e  $H_4$ , no entanto, os resultados distintos para cada substituinte sugeriram informações importantes dos receptores. Os substituintes mostraram-se mais seletivos e as afinidades melhoradas para o receptor  $H_3$  indicando que a presença de um grupo alquil aumenta a afinidade por esse receptor, uma vez que o composto LINS 01001 sem substituintes não demonstrou afinidade ( $K_i H_3R = > 100 \mu M$ ) e destaca-se entre os substituintes o grupo alil (LINS 01004) que apresentou a melhor afinidade dos compostos da série ( $K_i H_3R = 7 \pm 1,5 \mu M$ ), com exceção do composto LINS 01005 que apresentou afinidade semelhante para ambos receptores (CORRÊA et al., 2017a). Cowart *et al.* (2004) em seu trabalho publicado corrobora os resultados encontrados pelo nosso grupo.

As afinidades obtidas para o receptor  $H_4$  não foram significativas e seletivas. A presença do substituinte *N*-metil não aumentou a afinidade do composto (CORRÊA et al., 2017a) em contradição como o demonstrado em pesquisas realizadas por HTS (VENABLE et al., 2005) e no trabalho publicado por Jablonowski *et al.* (2003) para compostos com o núcleo indólico. A baixa afinidade pode ser atribuída também a ausência da carbonila em combinação com a modificação do núcleo indólico para benzodihidrofurânico que foi explorado neste trabalho. Somente o composto LINS 01005 apresentou afinidade relevante ( $K_i H_4R = 28 \pm 3,8 \mu M$ ), porém essa afinidade também foi observada para o receptor  $H_3$  ( $K_i H_4R = 17 \pm 4,9 \mu M$ ). Até o momento, estudos de modelagem molecular estão sendo realizados para avaliar a importância de cada substituinte (CORRÊA et al., 2017a).

Em sua dissertação de mestrado, Barbosa (2017) explorou substituintes no núcleo benzodihidrofurânico ( $R'$ ), baseando-se no protótipo LINS 01003 e prosseguiu

com os compostos da série LINS 01 que estão reunidos na figura 27 juntamente com os resultados observados (CORRÊA et al., 2017b).

**Figura 27** – Compostos 5-substituídos da série LINS 01.



Os resultados obtidos no teste de *binding* realizados a partir de nova metodologia para os ligantes 5-substituídos utilizando células HEK293T que expressam transitoriamente os receptores H<sub>3</sub> e H<sub>4</sub>, demonstram que os substituintes nessa porção do arcabouço propicia melhor afinidade para ambos receptores em comparação com os primeiros compostos dessa série. É observado que grupos volumosos nessa posição favorecem a afinidade para o receptor H<sub>3</sub>, semelhantemente a molécula ABT-239 (figura 15). Para o receptor H<sub>4</sub>, os compostos LINS 01007 e LINS 01008 mostraram relativa afinidade, sendo que o melhor resultado de afinidade foi demonstrada pelo composto LINS 01007, embora este também tenha interagido de forma semelhante com o receptor H<sub>3</sub> (BARBOSA, 2017; CORRÊA et al., 2017b).

Diante dos resultados preliminares apresentados pelos compostos LINS 01005 e LINS 01007 para os receptores H<sub>3</sub> e H<sub>4</sub>, estes foram testados quanto a sua atividade anti-inflamatória e esta foi comprovada com dose administrada de 5 mg/kg e 3 mg/kg *in vivo* para modelo de asma, respectivamente (CORRÊA; FERNANDES, 2018).

No trabalho publicado por Corrêa *et al.* (2017b) também foram avaliados por essa nova metodologia de *binding* os primeiros quatro compostos da série LINS 01 e os resultados obtidos (tabela 1) foram melhores em relação aos primeiros (figura 26), porém, da mesma forma que observado anteriormente, esses compostos apresentaram-se mais seletivos para o receptor H<sub>3</sub> e contraditoriamente para o composto LINS 01005 não foi obtida afinidade para ambos receptores como

divulgado anteriormente. Os  $K_i$  observados para todos os compostos da série LINS 01 avaliados até então apresentaram-se na faixa de 0,4 a 10  $\mu\text{M}$ .

**Tabela 1** – Resultados de  $pK_i$  obtidos em teste de *binding* por nova metodologia para os primeiros compostos da série LINS 01.

Compostos	H <sub>3</sub> R $pK_i$	H <sub>4</sub> R $pK_i$
LINS 01001	< 5,0	< 5,0
LINS 01003	5,57 $\pm$ 0,17	< 5,0
LINS 01004	6,40 $\pm$ 0,21	< 5,0
LINS 01005	< 5,0	< 5,0

Em uma posterior publicação por nosso grupo, após realizado novamente teste de *binding* para o receptor H<sub>3</sub> com a série LINS 01 e constatada a atividade de antagonista ou agonista inverso fraco da série, os ligantes da série foram testados quanto a afinidade por receptores H<sub>1</sub> e H<sub>2</sub> neste mesmo trabalho (CORRÊA et al., 2019). As afinidades dos ligantes obtidas para o receptor H<sub>3</sub> mostraram-se semelhante aos resultados publicados anteriormente por Corrêa *et al.* (2017b) e o composto LINS 01001, que não obteve afinidade pelo receptor H<sub>3</sub>, apresentou a maior afinidade detectada, ainda que considerada muito fraca, para o receptor H<sub>1</sub> e nenhum dos ligantes demonstrou afinidade pelo receptor H<sub>2</sub>. Em relação a atividade, nenhum dos compostos avaliados foram agonistas dos receptores testados (CORRÊA et al., 2019).

A importância do *N*-substituinte piperazínico alquil para melhorar a afinidade pelo receptor H<sub>3</sub> foi esclarecido através da REA. O composto não substituído (LINS 01001) não apresentou afinidade pelo receptor H<sub>3</sub> e sim pelo H<sub>1</sub>. A presença dos substituintes *N*-metil (LINS 01003) e *N*-alil (LINS 01004) melhorou a afinidade, indicando que nessa porção há uma interação hidrofóbica, no entanto, esta pode ser limitada pois o ligante LINS 01005 com o *N*-substituinte fenil não demonstrou afinidade, que pode ser atribuída a impedimento estérico ou ainda pela redução da basicidade do nitrogênio (CORRÊA et al., 2019)

Neste trabalho ainda, foram analisadas algumas métricas importantes na fase de desenvolvimento de novas moléculas, que demonstram a importância dos substituintes nos compostos em relação ao receptor H<sub>3</sub> como a eficiência dos ligantes (EL), qualidade do ajuste (QA), eficiência dos ligantes corrigida pela

lipofilicidade (ELCL), eficiência do ligante lipofílico (ELL) e eficiência do grupo (EG). Os valores encontrados para a EL e QA mostraram que todos os compostos da série LINS 01 são promissores em relação a esses parâmetros. A avaliação realizada frente a ELCL e ELL evidenciam que o substituinte fenil contribui negativamente para esses parâmetros por aumentar expressivamente a lipofilicidade, característica essa não desejada a ligantes ainda em desenvolvimento, e que o composto LINS 01009 (com o substituinte metoxila) diminuiu a lipofilicidade da molécula. Analisando a EG, as modificações dos *N*-substituintes demonstram ser mais importantes e que a presença do grupo metil contribui significativamente para a afinidade ao receptor H<sub>3</sub> (CORRÊA et al., 2019). Os compostos benzodi-idroindólicos ainda não foram analisados por nosso grupo, mas compõem uma classe de ligantes que merecem ter sua afinidade avaliada e futura REA investigada.

### 3 OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA

#### 3.1 Objetivo

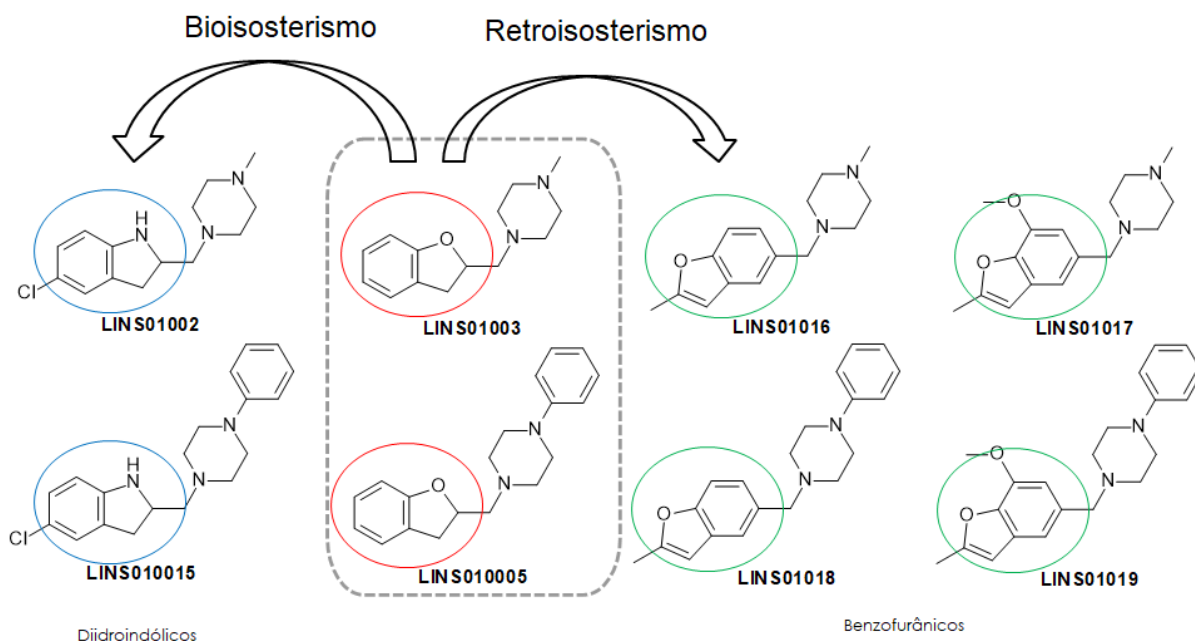
O objetivo deste trabalho foi preparar compostos contendo grupos heteroaromáticos (benzofurano ou di-idroindol) e um grupo piperazina *N*-substituído que possam apresentar afinidade pelos receptores H<sub>3</sub> e H<sub>4</sub> e futuramente atuar em condições inflamatórias e comportamentais que envolvam tais receptores. Especificamente, os objetivos deste trabalho são:

- Sintetizar os compostos com maior pureza e rendimentos possíveis;
- Caracterizar os compostos obtidos através de técnicas espectroscópicas;
- Avaliar a afinidade dos compostos através do ensaio de *binding* nos receptores H<sub>3</sub> e H<sub>4</sub>;
- Avaliar a atividade desses compostos como agonistas ou antagonistas / agonistas inversos.

#### 3.2 Justificativa

Diante do dados reunidos na revisão bibliográfica, os receptores H<sub>3</sub> e H<sub>4</sub> requerem atenção na clínica devido ao envolvimento destes na evolução de diversas doenças e, em razão disso, são os principais alvos para o tratamento.

Considerando o potencial dessa classe química e os resultados observados no teste de *binding* para os ligantes LINS 01003 no receptor H<sub>3</sub> e LINS 01005 para ambos receptores foram planejados compostos 2-metilbenzofurânicos e diidroindólicos para avaliar suas afinidades por receptores H<sub>3</sub> e H<sub>4</sub> (figura 28).

**Figura 28** – Compostos planejados para este trabalho.

Os compostos 2-metilbenzofurânicos (LINS 01016 a LINS 01019) seriam explorados quanto a aromaticidade em todo o núcleo heterociclo, uma vez que assemelham-se ao ABT-239 (benzofurânicos – figura 15) e JNJ 7777120 (indolcarboxamidas – figura 21) e são considerados retroisósteros dos compostos protótipos. Os compostos diidroindólicos (LINS 01002 e LINS 01015) seriam avaliados em relação a ausência da carbonila presente no JNJ 7777120 e ao grupo doador de ligação de hidrogênio (NH), se a presença deste propicia a maior afinidade pelos receptores H<sub>3</sub> e H<sub>4</sub>, principalmente H<sub>4</sub>, da mesma forma que ocorre nas indolcarboxamidas e são considerados bioisósteros das moléculas protótipos.

Os ligantes propostos neste trabalho foram planejados a partir de características estruturais presentes em ligantes de H<sub>3</sub> e H<sub>4</sub>, considerando a presença do núcleo aril-heterocíclico, do grupo polar e a presença de um substituinte hidrofóbico adicional no grupo polar. Estruturalmente, os compostos foram planejados de forma a assegurar a presença das características farmacofóricas para interação com os receptores e mantiveram os principais substituintes que apresentaram resultados mais relevantes.

Todos os compostos apresentam um grupo polar de característica básica protonável em pH fisiológico para interação com o aminoácido Asp (H<sub>3</sub>R 114<sup>3,32</sup> e H<sub>4</sub>R 94<sup>3,32</sup>), sendo esta uma porção farmacofórica, além do grupo heteroaril que



apresenta aromaticidade e que possui a distância do grupo polar básico similar à distância dos compostos já publicados.

As características para que ocorra a interação com o receptor H<sub>3</sub> foram mantidas para esses ligantes. Pode-se agrupar os compostos 2-aminometilbenzofuranos como análogos rígidos do ciproxifano (figura 11) (COWART et al., 2004), assim como é caracterizado o ABT-239 (figura 15), molécula a qual esses compostos se assemelham, entretanto possuem o núcleo benzofurânico invertido. Pequenos grupos alifáticos como *N*-substituintes da piperazina demonstraram incrementar a afinidade (CORRÊA et al., 2017a; COWART et al., 2004) e nosso grupo mostrou em seus resultados que o substituinte alila pode melhorar ainda mais afinidade. Inicialmente, o grupo fenil apresentou relevante afinidade para ambos receptores e merece ser avaliado (CORRÊA et al., 2017a). Já os substituintes alquílicos no grupo heteroaromático para os benzodihidrofurânicos foram melhores suportados e aumentaram a afinidade (BARBOSA, 2017).

Avaliando os compostos planejados em relação as suas características para interação com o receptor H<sub>4</sub>, os diidroindólicos assemelham-se ao protótipo JNJ 7777120, exceto pela aromaticidade em todo o anel heterociclo. Para melhor afinidade, o *N*-substituinte metil no grupo polar básico mostrou ser o melhor substituinte para as indolcarboxamidas, favorecendo a afinidade (JABLONOWSKI et al., 2003), toda via, o teste de *binding* inicial apresentado no trabalho de Corrêa et al. (2017a) indica que para a série LINS 01 o substituinte fenil pode ser promissor e merece ser avaliado neste arcabouço. O átomo de cloro na posição 5 do anel heteroaromático apresenta importância na afinidade com o receptor (BARBOSA, 2017; JABLONOWSKI et al., 2003).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Reagentes e vidrarias

Os reagentes (vide tabela 2) e vidrarias utilizados nessa pesquisa foram adquiridos comercialmente.

**Tabela 2** – Reagentes / materiais utilizados.

Reagentes / Material	Origem	Grau de Pureza / Especificação
4-Cloroanilina	Sigma-Aldrich	98%
Brometo de alila	Sigma-Aldrich	97%
Carbonato de potássio	Vetec	99,0%
Acetona	LabSynth	99,5
4-hidróxibenzaldeído	Sigma-Aldrich	98,0%
Vanilina	Casa Americana	99,5%
Diclorometano	LabSynth	99,0%
Sulfato de sódio anidro	LabSynth	99,0%
Acetato de etila	LabSynth	99,0%
Hexano	LabSynth	99,5%
1-Metilpiperazina	Sigma-Aldrich	99%
Fenilpiperazina	Sigma-Aldrich	99%
Triacetóxi-borohidreto de sódio	Sigma-Aldrich	97%
Tetraidrofurano	LabSynth	99,0%
Éter Etílico	LabSynth	98,0%
Sílica Gel 60 para cromatografia em coluna	Merck	0,040 – 0,063 mm

### 4.2 Equipamentos

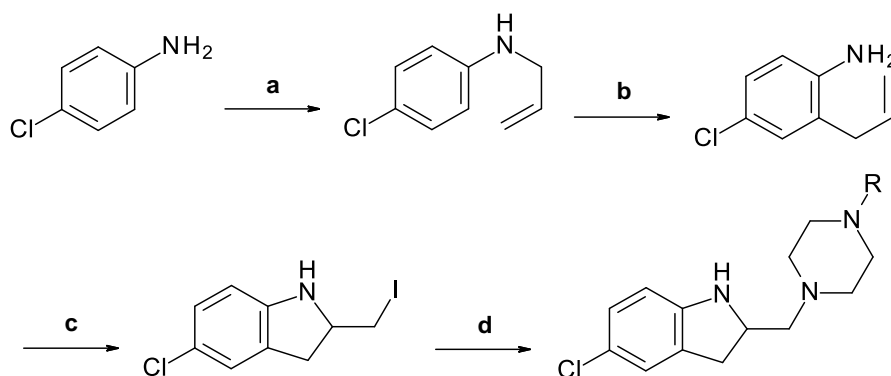
- Balança analítica Shimadzu, modelo: ATY224 (Laboratório de Insumos Naturais e Sintéticos – LINS – Unidade José de Alencar);
- Lavadora ultrassônica de 40kHz com banho termostatizado Q1.8/40A (Eco-sonics) (Laboratório de Insumos Naturais e Sintéticos – LINS – Unidade José de Alencar);

- Micro-ondas Discover System (CEM) (Laboratório de Insumos Naturais e Sintéticos – LINS – Unidade José de Alencar);
- Evaporador rotativo R-210 (Büchi) (Laboratório de Insumos Naturais e Sintéticos – LINS – Unidade José de Alencar);
- Espectrômetro de RMN Bruker Advance 300 operando a 300 MHz ( $^1\text{H}$ ) e 75 MHz ( $^{13}\text{C}$ ) (Centro de Equipamentos e Serviços Multiusuários - CESM e Núcleo de Instrumentação para Pesquisa e Ensino – NIPE / Unidade José de Filippi);
- Cromatógrafo gasoso GC-2010 acoplado ao espectrômetro de massas (CG-EM) GCMS-QP2010 Plus (Centro de Equipamentos e Serviços Multiusuários - CESM e Núcleo de Instrumentação para Pesquisa e Ensino – NIPE / Unidade José de Filippi).

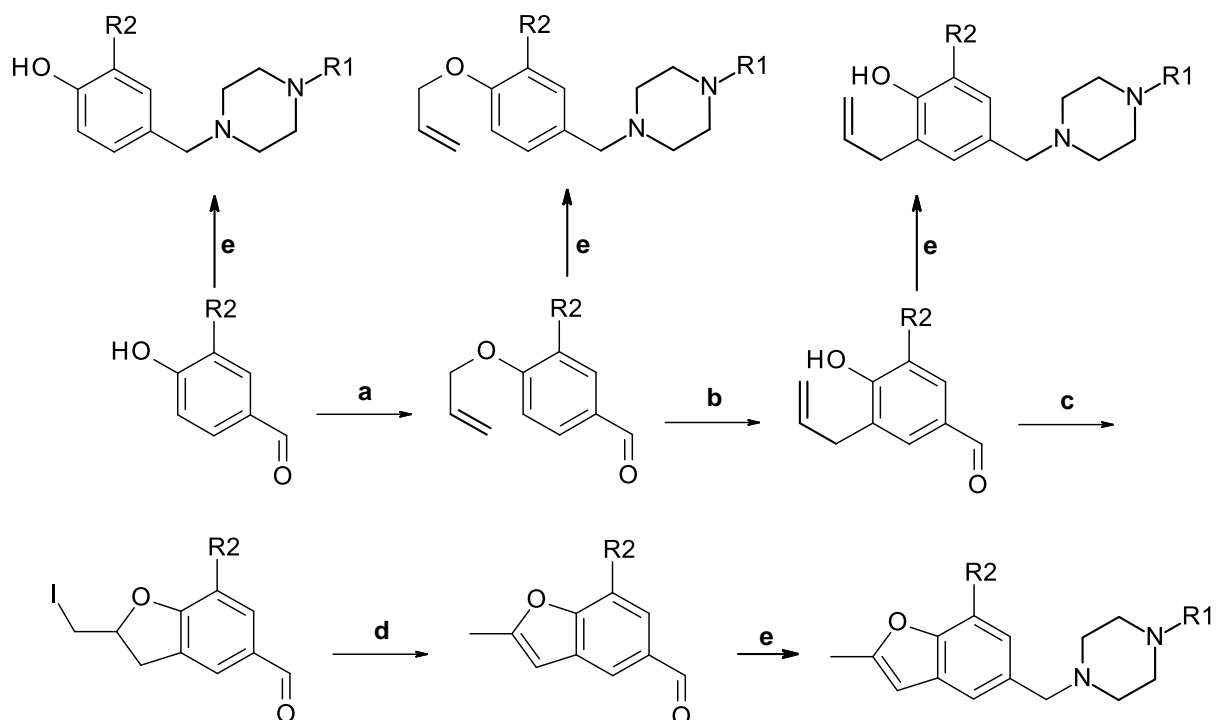
### 4.3 Estratégia Sintética

As estratégias sintéticas planejadas para este trabalho seguem nas figuras 29 e 30:

**Figura 29** – Procedimento sintético para os diidroindóis.



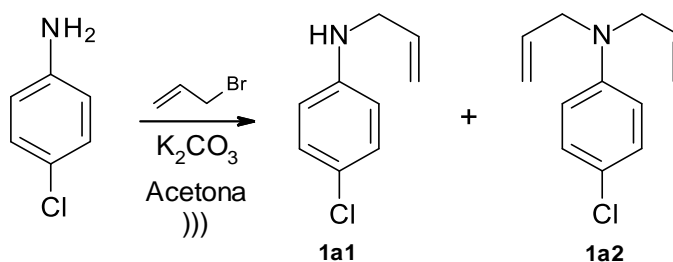
**a.** brometo de alila (1,5 eq.),  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (1,5 eq.), acetona, 4 h )); **b.** 170 °C,  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  (1 eq.), tolueno, 45 minutos MW; **c.**  $\text{I}_2$  (1,1 eq.),  $\text{H}_2\text{O}$ , 12 h; **d.** R-piperazina (4 eq.),  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (2 eq.), THF, refluxo 18 h.

**Figura 30** – Planejamento sintético para os benzofurânicos.

Procedimento sintético para os compostos finais. **a.** brometo de alila (2 eq.),  $K_2CO_3$  (2 eq.), acetona, 4 h )); **b.** 200 °C, água, 1 h MW; **c.**  $I_2$  (1,1 eq.),  $H_2O$ , 4 h; **d.** Alumina, 160 °C, 30 min.; **e.** R-piperazina (1,2 eq.), THF, 1h,  $NaBH(OAc)_3$  (2 eq.), - 5 °C, *overnight*.

#### 4.3.1 Compostos diidroindólicos

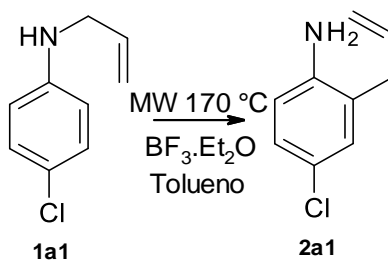
##### Preparação da N-alil-4-cloroanilina

**Figura 31** – Alilação da 4-cloroanilina.

Em um balão foram adicionados 5 mmol (0,6379 g) de 4-cloroanilina, 7,5 mmol (0,9074 g) de brometo de alila, 7,5 mmol (1,0366 g) de carbonato de potássio e 30 mL de acetona. A mistura agitada em banho de ultrassom por 4 horas em temperatura ambiente. Após evaporação, o resíduo foi ressuspensionado com 10 mL de Hex:AcOEt (9:1) e a solução foi lavada duas vezes com 10 mL de água destilada. A fase orgânica foi separada, secada em sulfato de sódio anidro e evaporada. O produto bruto foi purificado em cromatografia de sílica gel com uma solução de hexano:AcOEt (9:1) para obtenção do intermediário **1a1**. O rendimento bruto obtido foi de 69-78%.

#### *Preparação da 2-alil-4-cloroanilina*

**Figura 32** – Rearranjo de Claisen da *N*-alil-4-cloroanilina.



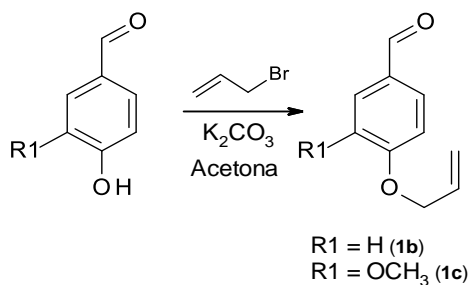
Fonte: Próprio autor desenhado com o software Biovia Draw®.

Em tubo para micro-ondas, foram adicionados 2 mmol (0,3352 g) de **1a1**, 2 mmol (0,2838 g) de trifluoreto de boro dietil eterado ( $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ ) e 2 mL de tolueno. A mistura foi submetida à irradiação por microondas (170 °C) por 45 minutos. Ao final, a mistura foi lavada três vezes com 5 mL de NaOH 0,1 M e 5 mL de água destilada. A fase orgânica foi secada em sulfato de sódio anidro e evaporada. O produto bruto foi purificado em coluna de sílica gel com uma solução de hexano:AcOEt (1:1). O rendimento obtido foi de 36-45%.

### 4.3.2 Compostos benzofurânicos

#### *Preparação dos alil-fenil éteres*

**Figura 33** – Alilação dos fenóis.



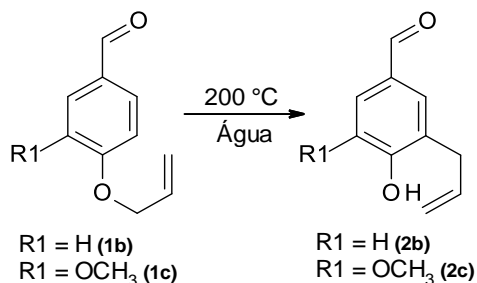
Em um balão foram adicionados 5 mmol do fenol adequado (4-hidroxibenzaldeído ou vanilina), 10 mmol (1,2098 g) de brometo de alila, 10 mmol (1,3821 g) de carbonato de potássio e 30 mL de acetona. A mistura foi mantida sob refluxo *overnight*. Ao final, o solvente foi evaporado, o resíduo foi ressuspensionado com 10 mL de diclorometano (DCM) e a mistura foi lavada duas vezes com 10 mL de água destilada. A fase orgânica foi separada, secada com sulfato de sódio anidro e evaporada. O produto bruto foi purificado em coluna de sílica gel com uma solução de hexano:AcOEt (5:1). Os rendimentos são apresentados na tabela 3.

**Tabela 3** – Rendimentos obtidos na alilação dos fenóis.

Fenol	Quantidade	Rendimento
1b	0,6106 g	75-78%
1c	0,7608 g	71-88%

### Preparação dos 2-alilfenóis

**Figura 34** – Rearranjo de Claisen dos alil-fenil éteres.



Em tubo selado, foram adicionados 1 mmol do alil-fenil éter adequado (**1b** ou **1c**) e 1 mL de água destilada. A mistura foi submetida à irradiação por microondas (200 °C) por 90 minutos. Ao final, adicionou-se 10 mL de água destilada e a mistura foi extraída duas vezes com 10 mL de DCM. As fases orgânicas foram reunidas, secadas com sulfato de sódio anidro e evaporadas. O produto bruto foi purificado em coluna de sílica gel com uma solução de hexano:AcOEt (4:1). Os rendimentos obtidos são apresentados na tabela 4.

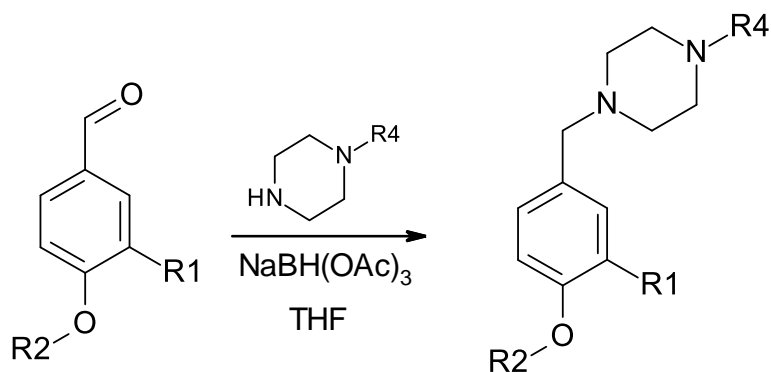
**Tabela 4** – Rendimentos obtidos no rearranjo dos alil-fenil éteres.

Alil-fenil éter	Quantidade	Rendimento
2b	0,1622 g	37-69%
2c	0,1922 g	67%

*Preparação dos compostos piperazínicos*

**Figura 35** – Preparação dos compostos piperazínicos.

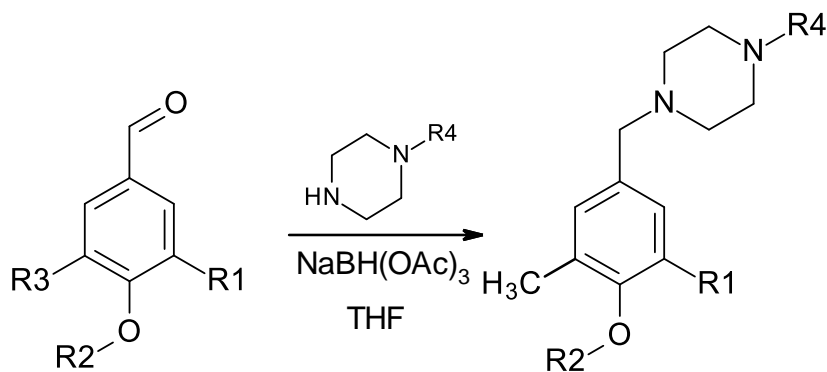
1) 4-hidroxibenzaldeído



R1 / R2 = H ou alil  
R4 = CH<sub>3</sub> ou C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>

R1 = H / R2 = H / R4 = CH<sub>3</sub> (**3b**)  
R1 = H / R2 = H / R4 = C<sub>6</sub>H<sub>5</sub> (**4b**)  
R1 = H / R2 = alil / R4 = CH<sub>3</sub> (**5b**)  
R1 = H / R2 = alil / R4 = C<sub>6</sub>H<sub>5</sub> (**6b**)  
R1 = alil / R2 = H / R4 = CH<sub>3</sub> (**7b**)  
R1 = alil / R2 = H / R4 = C<sub>6</sub>H<sub>5</sub> (**8b**)

2) Vanilina



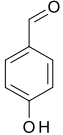
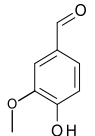
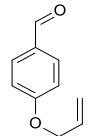
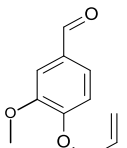
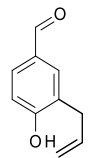
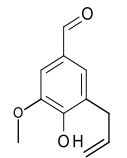
R1 / R2 = H ou alil  
R3 = OCH<sub>3</sub>  
R4 = CH<sub>3</sub> ou C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>

R1 = H / R2 = H / R3 = OCH<sub>3</sub> / R4 = CH<sub>3</sub> (**3c**)  
R1 = H / R2 = H / R3 = OCH<sub>3</sub> / R4 = C<sub>6</sub>H<sub>5</sub> (**4c**)  
R1 = H / R2 = alil / R3 = OCH<sub>3</sub> / R4 = CH<sub>3</sub> (**5c**)  
R1 = H / R2 = alil / R3 = OCH<sub>3</sub> / R4 = C<sub>6</sub>H<sub>5</sub> (**6c**)  
R1 = alil / R2 = H / R3 = OCH<sub>3</sub> / R4 = CH<sub>3</sub> (**7c**)  
R1 = alil / R2 = H / R3 = OCH<sub>3</sub> / R4 = C<sub>6</sub>H<sub>5</sub> (**8c**)



Em um balão foram adicionados 1 mmol dos aldeídos adequados, 1,2 mmol do derivado piperazínico (1-metil ou 1-fenilpiperazina) e 10 mL de THF. A mistura foi mantida sob agitação por 1 hora e a seguir foram adicionados 2 mmol (0,4239 g) de triacetóxi-boroidreto de sódio (STAB-H) previamente dispersos em 5 mL de THF. A reação foi mantida em banho de gelo e agitada *overnight*. Ao final, a mistura foi evaporada, o resíduo ressuspendido com solução saturada de bicarbonato de sódio e extraída com duas porções de 10 mL de éter. As fases orgânicas foram reunidas, secadas com sulfato de sódio anidro e evaporadas. Os produtos brutos obtidos com a metilpiperazina foram purificados em coluna de sílica gel com uma solução de DCM:MeOH (15:1) e os produtos brutos obtidos com a fenilpiperazina foram purificados em coluna de sílica gel com uma solução de hexano:AcOEt (1:1). Os rendimentos obtidos são apresentados na tabela 5.

**Tabela 5** – Rendimentos obtidos na preparação dos compostos piperazínicos.

Aldeído	Quant.	Piperazina	Quant.	Rendimento	Composto
 4-hidroxibenzaldeído	0,1221 g	Metil	0,1201 g	32-64%	3b
		Fenil	0,1946 g	ND	4b
 Vanilina	0,1522 g	Metil	0,1201 g	30-74%	3c
		Fenil	0,1946 g	25%	4c
 4-aliloxibenzaldeído	0,1622 g	Metil	0,1201 g	77%	5b
		Fenil	0,1946 g	89%	6b
 4-aliloxi-3-metoxibenzaldeído	0,1922 g	Metil	0,1201 g	32%	5c
		Fenil	0,1946 g	31%	6c
 3-alil-4-hidroxibenzaldeído	0,1622 g	Metil	0,1201 g	93%	7b
		Fenil	0,1946 g	~ 6%	8b
 5-alil-4-hidroxi-3-metoxibenzaldeído	0,1922 g	Metil	0,1201 g	38%	7c
		Fenil	0,1946 g	32%	8c

#### 4.4 Caracterização estrutural e de pureza

Os produtos obtidos foram caracterizados por ressonância magnética nuclear de hidrogênio ( $^1\text{H}$ -RMN) e carbono ( $^{13}\text{C}$ -RMN) e por espectrometria de massas de baixa resolução (EMBR). Os espectros de RMN são dados em deslocamento químico ( $\delta$ , em ppm) utilizando tetrametilsilano como padrão interno e o solvente deuterado adequado. Os espectros de massas foram obtidos após ionização por elétrons (IE), resultando nos íons apresentados com as respectivas intensidades relativas.

A pureza dos compostos foi avaliada por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM), utilizando coluna RESTEK Modelo: Rtx-5ms Dimensões: 30 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu\text{m}$  e nas seguintes condições: temperatura inicial 80 °C, seguida por aquecimento de 10 °C/min até a temperatura máxima de 250 °C (mantida por 11 e 26 minutos para os métodos de tempo de corrida de 30 e 45 minutos, respectivamente). A interface do detector foi ajustado para a temperatura de 200 °C. Foram considerados puros os produtos com teor superior a 95% medidos através da área de íons totais.

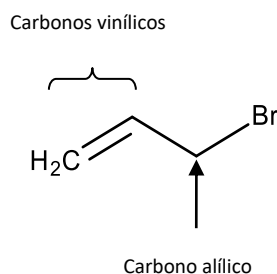
## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Síntese dos compostos

As reações de *N*-alilação e *O*-alilação realizadas na primeira etapa para obtenção dos compostos deste trabalho são reconhecidas como reação de substituição nucleofílica. De modo geral, as reações de substituição nucleofílica ocorrem quando um reagente nucleófilo (espécie que possui um par de elétrons disponível não ligante ou carga negativa) ataca um substrato eletrófilo (espécie deficiente em elétrons) (VOLLHARDT; SCHORE, 2004).

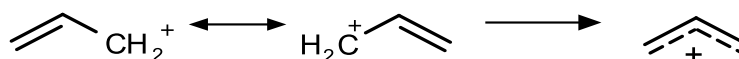
Para obtenção dos produtos *N*- e *O*-alilados foi utilizado na reação o agente alquilante brometo de alila (figura 36) que, conforme o nome sugere, apresenta o grupo alila. O grupo alila é caracterizado por um carbono alílico com hibridização  $sp^3$  e dois carbonos vinílicos com hibridização  $sp^2$  (CAREY, 2011).

**Figura 36** – Brometo de alila.



A dissociação dos halogenetos de alila formam os carbocátions alílicos, onde o carbono alílico apresenta uma carga positiva (figura 37). O carbocátion alílico apresenta estabilidade devido ao grupo vinílico que possui a capacidade de doar elétrons ao carbono com carga positiva. A carga positiva do carbono alílico torna-se deslocalizada devido a movimentação do par de elétrons, aumentando sua estabilidade em relação a um carbocátion primário alquílico (CAREY, 2011; VOLLHARDT; SCHORE, 2004).

**Figura 37** – Carbocátion alílico em ressonância.



As reações de substituição nucleofílica com halogenetos de alila podem ser do tipo unimolecular ( $S_N1$ ) ou bimolecular ( $S_N2$ ) e algumas características do agente alquilante juntamente com o meio reacional podem conferir preferência para um dos dois possíveis mecanismos. A estabilidade que é conferida ao carbocátion alílico pode sugerir que o mecanismo dessa reação ocorra através da  $S_N1$ , onde a dissociação do brometo de alila é a etapa que controlaria a velocidade da reação e após essa etapa, ocorreria o ataque nucleofílico dos pares de elétrons disponíveis do nitrogênio presente na 4-cloroanilina ou do oxigênio presente no 4-hidroxibenzaldeído e 3-metóxi-4-hidroxibenzaldeído ao carbocátion alílico. No entanto, para o agente alquilante brometo de alila, a substituição nucleofílica bimolecular,  $S_N2$ , indica ser o mecanismo de reação mais provável devido ao substrato ser primário, não possuir grupos volumosos como substituintes que impediriam estericamente o ataque nucleofílico, o brometo ( $Br^-$ ) ser um bom grupo de saída por ser uma base fraca e pelo uso de um solvente polar aprótico que favorece a reatividade do nucleófilo por solvatar parcialmente os contra-íons (NASCIMENTO; FERNANDES, 2017; VOLLHARDT; SCHORE, 2004).

O uso do carbonato de potássio na reação tem por finalidade basificar a mistura reacional, uma vez que um dos subprodutos dessa reação será o ácido bromídrico (HBr) e no caso dos compostos oxigenados, a base adicionada tem a capacidade aumentar a nucleofilicidade por formar o íon fenolato facilitando, assim, o ataque nucleofílico ao carbono alílico do substrato (FERNANDES et al., 2011).

O método para as reações de *N*-alilação envolvendo a 4-cloroanilina foram realizadas utilizando a relação estequiométrica de 4-cloroanilina, brometo de alila e carbonato de potássio de 1:1,5:1,5 em acetona por um período de 4 horas em banho de ultrassom e em temperatura ambiente (NASCIMENTO; FERNANDES, 2017). Na literatura, resultados obtidos por Ayala *et al.* (2006) utilizando metodologia semelhante (2 equivalentes de brometo de alila, acetona e carbonato de potássio), no entanto por metodologia convencional sob refluxo de 6 a 8 horas mostraram rendimentos de 65 a 95%. Da mesma maneira, Majumdar *et al.* (2006) explorou a *N*-alilação de anilinas por metodologia convencional com duração de reação de 10 a 25 horas e obteve rendimentos entre 60 e 95% e os resultados apresentados assemelham-se ao resultado bruto obtido com a alilação neste trabalho (tabela 6).

**Tabela 6** – Rendimento bruto obtido experimentalmente para alilação da 4-cloroanilina.

Experimento	Rendimento bruto (%)
1	78
2	69

Entretanto, as anilinas utilizadas pelos grupos de pesquisa citados são aminas secundárias, onde não há a possibilidade de formação de subproduto *N,N*-dialilado. Assim, havia a necessidade de encontrar condições ideais que permitissem a obtenção do maior rendimento do produto monoalilado de interesse e a menor proporção do produto indesejado dialilado.

O rendimento bruto dessa reação é a somatória do produto de interesse, *N*-alilado, e do subproduto, *N,N*-dialilado. Assim, avaliou-se o rendimento apenas do produto de interesse através da porcentagem presente deste após análise em cromatógrafo gasoso acoplado ao espectrômetro de massas (CG-EM) e o resultado obtido foi de 45%.

Du *et al.* (2013) descreveu as condições ideais encontradas para a síntese de anilinas *N,N*-dialiladas e reportou os rendimentos isolados tanto para os subprodutos das reações que seriam as anilinas *N*-aliladas quanto para os produtos de interesse e apresentou o rendimento isolado encontrado para a 4-cloroanilina *N*-alilada de 10%. Embora as metodologias utilizadas neste trabalho e por Du *et al.* (2013) apresentem diferenças entre si como solvente e temperatura da reação, é possível observar que a temperatura de 70 °C aplicada na metodologia de Du *et al.* (2013) influencia de forma relevante na menor porcentagem de monoalilado por favorecer a formação de dialilado, correlação amplamente explorada e discutida no trabalho publicado por Nascimento e Fernandes (2017).

Nascimento e Fernandes (2017) propuseram através de um estudo fatorial 2<sup>2</sup> e 2<sup>3</sup> a síntese da *N*-alilação de anilina. O objetivo foi obter rendimento e proporção máxima do produto de interesse, minimizando ou até mesmo extinguindo a síntese do produto indesejado *N,N*-dialilado, além de propor um método utilizando o banho ultrassônico que otimiza o tempo reacional, torna o processo mais conveniente e “verde”. Inicialmente foi avaliada a influência da quantidade de brometo de alila (1,5 e 2,0 equivalentes) e a temperatura da reação (25 °C e 60 °C) por metodologia convencional e mantendo-se a quantidade de 5 mmol de 4-cloroanilina, sendo este o

estudo fatorial 2<sup>2</sup>. Os resultados obtidos demonstraram que as quantidades de brometo de alila (e carbonato de potássio) não influenciam no rendimento (monoalilado e total) e na proporção de monoalilado (tabela 7).

**Tabela 7** – Resultados dos rendimentos para metodologia convencional por 24h.

Brometo de alila (mmol)	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (mmol)	Temperatura (°C)	Rendimento Monoalilado (%)	Rendimento Total (%)	Razão Monoalilado (%)*
7,5	7,5	25	52 ± 1,9	69 ± 0,1	76 ± 2,9
7,5	7,5	60	40 ± 3,4	94 ± 1,3	43 ± 3,1
10,0	10,0	25	55 ± 5,1	76 ± 3,9	72 ± 2,9
10,0	10,0	60	36 ± 0,4	98 ± 1,1	37 ± 0,8

\*Calculado: % = (rendimento monoalilado/rendimento total x 100) (NASCIMENTO; FERNANDES, 2017).

Os resultados das reações na temperatura de 60 °C evidenciaram diminuição no rendimento individual e proporção de monoalilado (15,7% e 34,6% respectivamente), no entanto aumentou o rendimento total (23,4%). Esse resultado indica que a temperatura elevada aumenta a probabilidade de formação do dialilado, principalmente quando é utilizado a proporção de 2,0 equivalentes de brometo de alila e, sendo este um produto indesejado, a temperatura de 25 °C foi assumida para o estudo fatorial 2<sup>3</sup> na transposição de metodologia de convencional para ultrassom (US).

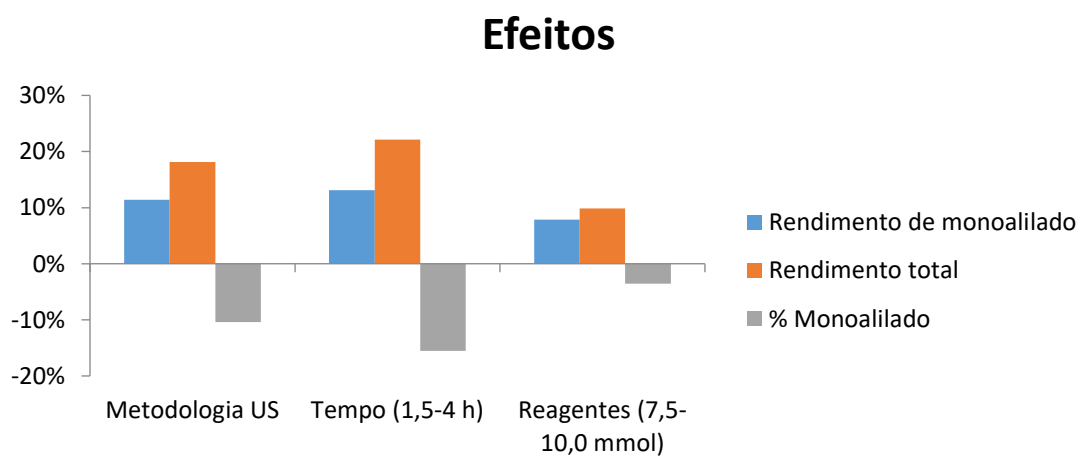
Os fatores variáveis escolhidos para o estudo fatorial 2<sup>3</sup> completo foram metodologia (convencional e ultrassom (US)), tempo (1,5 h e 4,0 h) e quantidade dos reagentes brometo de alila e carbonato de potássio (7,5 mmol e 10 mmol), mantendo-se a quantidade de 5 mmol de 4-cloroanilina. Os resultados estão reunidos na tabela 8.

**Tabela 8** – Condições experimentais para avaliar a metodologia, tempo de reação e quantidade de reagentes.

Metodologia	Tempo (horas)	Reagentes (mmol) (Brometo de alila e K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	Rendimento Monoalilado (%)	Rendimento Total (%)	Razão Monoalilado (%)*
Convencional (temperatura ambiente)	1,5	7,5	14 ± 0,5	14 ± 0,5	100 ± 0,0
Convencional (temperatura ambiente)	1,5	10,0	28 ± 0,2	28 ± 0,2	100 ± 0,0
Convencional (temperatura ambiente)	4,0	7,5	32 ± 0,7	35 ± 0,7	91 ± 0,2
Convencional (temperatura ambiente)	4,0	10,0	38 ± 1,4	45 ± 2,8	85 ± 2,2
Ultrassom (US)	1,5	7,5	28 ± 0,5	29 ± 0,5	96 ± 0,1
Ultrassom (US)	1,5	10,0	39 ± 2,5	43 ± 3,0	90 ± 0,4
Ultrassom (US)	4,0	7,5	45 ± 0,3	61 ± 0,5	74 ± 0,6
Ultrassom (US)	4,0	10,0	45 ± 0,1	61 ± 1,0	74 ± 1,2

\*Calculado: % = (rendimento monoalilado/rendimento total x 100) (NASCIMENTO; FERNANDES, 2017).

**Figura 38** – Representação gráfica dos efeitos gerados pela metodologia (convencional para US), tempo de reação (de 1,5 h para 4 h) e quantidade de reagentes (7,5 mmol para 10,0 mmol de ambos, brometo de alila e K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>).



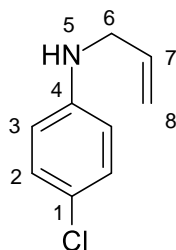
Fonte: (NASCIMENTO; FERNANDES, 2017).



Os efeitos dos resultados apresentados na figura 38, demonstram que a variação nas quantidades de reagentes fornece menor influência nas respostas. A alteração da metodologia aumentou significativamente todas as respostas, exceto na proporção de monoalilado. O tempo de reação é a variável com maior influência exibindo efeitos positivos sobre os rendimentos monoalílico e total, no entanto, um efeito negativo sobre a razão monoalilado.

Os resultados sugerem que a metodologia por ultrassom diminui a proporção do produto de interesse. No entanto, esse efeito é explicado pela maior taxa de produção da anilina *N*-alilada quando usada esta metodologia e não pelo efeito sonoquímico. Como pode ser visto na tabela 8, para que haja a formação da *N,N*-dialil-4-cloroanilina, é necessário que a *N*-alil-4-cloroanilina já esteja presente no meio reacional com proporção em torno de 30%, uma vez que só é possível a formação do subproduto *N,N*-dialilado quando há alguma quantidade de produto *N*-alilado. Por esse motivo, não é necessariamente a metodologia que afeta a distribuição dos produtos, mas sim o efeito da aceleração da reação com a agitação ultrassônica. Tal efeito é relacionado com o tempo de reação, sendo que os rendimentos de mono e dialilado aumentam concomitantemente ao tempo. Portanto, para apresentar o maior rendimento e proporção de monoalilado, a reação deve ser feita por no máximo 4 horas, em temperatura ambiente e com o uso do ultrassom.

A reação foi comprovada através dos resultados obtidos pelos espectros de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -RMN e massas. O espectro de  $^1\text{H}$ -RMN apresentou os sinais típicos dos hidrogênios aromáticos *p*-substituídos (6,51-6,55 ppm e 7,08-7,24 ppm) e os sinais do grupo alil sendo (5,87-5,96 ppm) hidrogênio alílico, (5,17 e 5,26 ppm) vinílicos e (3,73 ppm) alifáticos (apêndice 1 – página 99). Como esperado, foram obtidos os 7 sinais correspondentes aos átomos de carbono presentes na estrutura (apêndice 2 – página 100). A presença do íon radical (íon molecular) com  $m/z$  167 apresentado no espectro de massas, assim como o íon molecular de  $m/z$  140, gerado a partir da fragmentação do grupo alílico (apêndice 3 – página 101).



**1a1:** Óleo marrom.  $^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz,  $\delta$  = ppm, TMS): 3,73 (d,  $J$  = 5,3 Hz, 2H, H-6), 3,79 (sl, 1H, H-5), 5,17 (dd,  $J$  = 10,3, 1,3 Hz, 1H, H-8a), 5,26 (dd,  $J$  = 17,1, 1,5 Hz, 1H, H-8b), 5,87-5,96 (m, 1H, H-7), 6,51-6,55 (m, 2H, H-3), 7,08-7,24 (m, 2H, H-2).  $^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz,  $\delta$  = ppm, TMS): 46,6 (C-6), 114,0 (C-3), 116,5 (C-8), 122,0 (C-1), 129,0 (C-2), 135,0 (C-7), 146,6 (C-4). EMBR:  $m/z$  (int. rel.) = 167  $[\text{M}]^+$  (85), 140 (100).

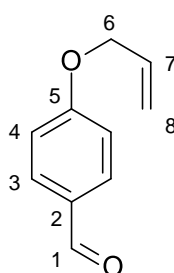
A proporção dos sinais de hidrogênio também comprova que o composto apresentado é a anilina *N*-alilada (**1a1**) e não *N,N*-dialilada (**1a2**) conforme apresentado no apêndice 1. Para o composto monoalilado, os sinais dos hidrogênios do grupo alila são proporcionais (1:1) aos sinais dos hidrogênios do anel aromático. Já na molécula dialilada, a presença de mais um grupo alílico dobra a proporção os sinais dos hidrogênios do grupo alila (2:1) em relação ao anel, demonstrando que estes sinais correspondem a quatro hidrogênios quando comparados com os sinais do anel aromático que representam dois hidrogênios cada (apêndice 4 – página 102).

As reações de *O*-alilação dos materiais de partida 4-hidroxibenzaldeído e vanilina seguiram metodologia desenvolvida pelo nosso grupo de pesquisa (CORRÊA et al., 2016). Para obtenção dos compostos deste trabalho, a proporção estequiométrica utilizada foi de 1:2:2 de 4-hidroxibenzaldeído ou vanilina, brometo de alila e carbonato de potássio, respectivamente, e por metodologia convencional. Os rendimentos obtidos para *O*-alilação do 4-hidroxibenzaldeído foi entre 75 e 78% e para vanilina de 71 a 88%.

Os resultados obtidos experimentalmente para *O*-alilação das moléculas precursoras dos compostos finais benzofurânicos são equiparáveis aos rendimentos relatados dessa mesma reação de 98% para vanilina (ZHOU et al., 2014) e de 90 a 98% para derivados de fenol (CORRÊA et al., 2016). Através do resultado apontado por Zhou *et al.* (2014) sob condições reacionais semelhantes (metodologia clássica

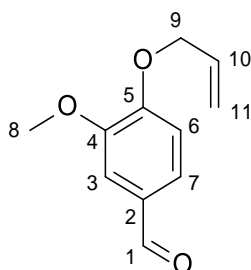
por 6 h e 1,3 equivalentes de brometo de alila) verifica-se que em 6 horas de reação o rendimento foi praticamente o ideal esperado (100%). Nas reações deste trabalho, a finalidade não foi explorar o tempo reacional cujo rendimento máximo seria obtido, sendo assim, as reações foram realizadas pelo período *overnight*. Ainda assim, podemos observar que apesar do tempo reacional superior a 6 horas, os rendimentos entre os trabalhos são semelhantes, o que sugere que o produto de interesse é formado em tempo menor ou igual a 6 horas. Correa *et al.* (2016) utilizou as mesmas proporções estequiométricas e condições reacionais e apresentou resultados equivalentes aos descritos acima.

A partir das reações de alilação para 4-hidroxibenzaldeído (**1b**) foram realizadas as análise de caracterização molecular e no espectro de  $^1\text{H}$ -RMN obtido é possível observar o sinal (9,86 ppm) referente ao hidrogênio do grupo aldeído, os sinais característicos dos hidrogênios aromáticos *p*-substituídos (7,00 e 7,81 ppm) e os sinais (5,99-6,08 ppm) hidrogênio alílico, (5,32 e 5,45 ppm) vinílicos e (4,60 ppm) alifáticos (apêndice 5 – página 103). Os sinais de carbonos obtidos através do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  apresentaram os sinais previstos de 8 carbonos (apêndice 6 – página 104). No espectro gerado pelo espectrômetro de massas, obteve-se o íon molecular de  $m/z$  162, correspondente a massa do composto alvo e dos fragmentos  $m/z$  121 e 41, proveniente da perda do grupo alílico da molécula de interesse e do próprio grupo alila, respectivamente (apêndice 7 – página 105).



**1b:** Óleo levemente amarelado.  $^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz,  $\delta$  = ppm, TMS): 4,60 (dd,  $J$  = 5,1, 1,3 Hz, 2H, H-6), 5,32 (dq,  $J$  = 10,4, 1,3 Hz, 1H, H-8a), 5,45 (dq,  $J$  = 17,2, 1,3 Hz, 1H, H-8b), 5,99-6,08 (m, 1H, H-7), 7,00 (d,  $J$  = 8,6, Hz, 2H, H-4), 7,81 (d,  $J$  = 8,6, Hz, 2H, H-3), 9,86 (s, 1H, H-1).  $^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz,  $\delta$  = ppm, TMS): 68,9 (C-6), 115,0 (C-4), 118,2 (C-8), 130,0 (C-2), 132,0 (C-3), 132,3 (C-7), 163,6 (C-5), 190,7 (C-1). EMBR:  $m/z$  (int. rel.) = 162 [ $\text{M}$ ] $^+$  (80), 121 (30), 41 (100).

O espectro de  $^1\text{H}$ -RMN originado pelo composto **1c**, apresentou o sinal (3,90 ppm) referente aos hidrogênios do grupo metoxila, (9,86 ppm) do hidrogênio do grupo aldeído, os sinais (6,96 e 7,39-7,42 ppm) dos hidrogênios aromáticos e os sinais (6,01-6,14 ppm) hidrogênio alílico, (5,21 e 5,45 ppm) vinílicos e 4,67 ppm alifáticos (apêndice 8 – página 106). Já o espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN demonstrou os sinais de 11 carbonos (apêndice 9 – página 107). O espectro de massas apresentou o íon molecular esperado de  $m/z$  192 e a fragmentação da molécula gerou os fragmentos  $m/z$  151 oriundos da eliminação do grupo alílico;  $m/z$  95, fenol gerado devido a fragmentações consecutivas do composto e  $m/z$  41 do grupo alílico, respectivamente (apêndice 10 – página 108).



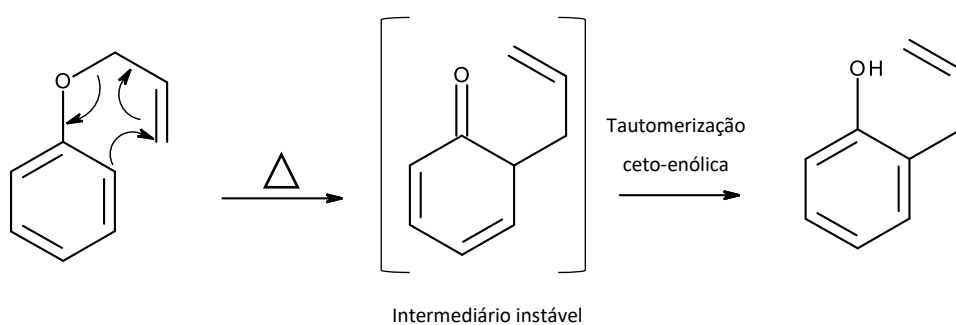
**1c:** Óleo levemente amarelado.  $^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz,  $\delta$  = ppm, TMS): 3,90 (s, 3H, H-8), 4,67 (dt,  $J$  = 5,4, 1,3 Hz, 2H, H-9), 5,32 (dq,  $J$  = 10,4, 1,4 Hz, 1H, H-11a), 5,45 (dq,  $J$  = 17,3, 1,4 Hz, 1H, H-11b), 6,01-6,14 (m, 1H, H-10), 6,96 (dd,  $J$  = 8,6, 2,7 Hz, 1H, H-7), 7,39-7,42 (m, 2H, H-3/6), 9,86 (s, 1H, H-1).  $^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz,  $\delta$  = ppm, TMS): 55,7 (C-8), 69,5 (C-9), 109,2 (C-3), 111,8 (C-6), 118,4 (C-11), 126,3 (C-7), 130,0 (C-2), 132,2 (C-10), 149,7 (C-5), 153,3 (C-4), 190,7 (C-1). EMBR:  $m/z$  (int. rel.) = 192 [ $\text{M}$ ] $^+$  (100), 151 (85), 95 (70), 41 (45).

Os rearranjos de Claisen são um dos rearranjos sigmatrópicos mais empregados na síntese orgânica por permitirem através de métodos fundamentados novas ligações estereosseletivas de carbono-carbono ou carbono-heteroátomo ao aquecer a mistura reacional de 150 a 200 °C e dentre os rearranjos de Claisen, destaca-se especificamente o rearranjo de Claisen aromático, uma vez que são amplamente utilizados em contrações de anéis, síntese de lactonas, entre outras reações (FREITAS et al., 2017). O rearranjo de Claisen é definido como uma reorganização térmica [3,3]-sigmatrópica no qual ocorre um processo intramolecular combinado e não síncrono (MAJUMDAR; ALAM; CHATTOPADHYAY, 2008).

O rearranjo de Claisen é um rearranjo [3,3]-sigmatrópico e é assim designado pois uma ligação  $\sigma$  é deslocada de uma extremidade da molécula para outra extremidade que faz parte de um sistema conjugado (ligação  $\pi$ ). Este rearranjo é uma reação concertada que ocorre em uma única etapa e o mecanismo proposto aceito é de uma reorganização de elétrons, pois o carbono final do grupo alila liga-se ao anel aromático (figura 39) (HIERSEMANN; NUBBEMEYER, 2007; MANDAL, 2018; MARTÍN-CASTRO; TORTOSA, 2014).

A posição que o grupo alílico ocupará é regida pela substituição do anel aromático, visto que se o anel não for substituído em posição *orto* e *para*, o rearranjo resultará em uma *orto*-substituição; se for substituído em *orto* inicialmente essa posição será ocupada, no entanto devido a incapacidade da rearomatização do anel, o grupo alil sofrerá novo rearranjo para a posição *para* do anel aromático, sendo este rearranjo denominado rearranjo de Cope. É importante destacar que não são observadas reações de rearranjo de Claisen em anéis aromáticos *orto* e *para* substituídos. A reorganização dos elétrons resulta em um intermediário ceto-enol instável, que por tautomerização, formará o fenol *orto*-substituído (FREITAS et al., 2017; MANDAL, 2018).

**Figura 39** – Rearranjo de Claisen aromático.



Semelhantemente ocorrem os rearranjos de amino-Claisen ou amino-Cope, assim designados quando o átomo de nitrogênio ocupa a posição do oxigênio. Este rearranjo ocorre mediante a condições reacionais extremas de temperatura (250 - 260 °C) devido a estrutura piramidal apresentada pela amina e, para que o átomo de nitrogênio assuma o estado planar, mais energia é demandada gerando assim degradação dos materiais de partida (MAJUMDAR et al., 2009; TYMOSHENKO, 2008).

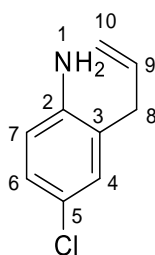
Uma abordagem amplamente benéfica para redução da temperatura é o uso de catalisadores como ácidos de Lewis, ácidos de Brønsted, metais de transição, entre outros (por exemplo  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ , ácido trifluoroacético,  $\text{AlCl}_3$ ,  $\text{PdCl}_2$ ) acelerada com a aplicação de micro-ondas (MAJUMDAR; ALAM; CHATTOPADHYAY, 2008).

O uso de micro-ondas em síntese orgânica tem sido um procedimento bastante empregado por acelerar a taxa das reações, controlar a temperatura uniformemente e conferir reprodutibilidade sintética. É um exemplo de melhoria em rotas sintéticas quando comparado a métodos de aquecimento descritos na literatura, estando de acordo com novas legislações ambientais e segurança (SHAIKH, 2017). O calor gerado nas reações é devido à ação direta da radiação micro-ondas sobre o solvente ou molécula que resulta em um movimento rotacional, colisões entre moléculas e geração de calor. Moléculas polares absorvem mais eficientemente as micro-ondas e aumentam a produção de calor na reação (MARTÍN-CASTRO; TORTOSA, 2014; SHAIKH, 2017).

As reações de Claisen para *N*-alil-4-cloroanilina (**1a1**) também foram realizadas em reator de micro-ondas e metodologia adaptada de Correa *et al.* (2016). Majumdar *et al.* (2009) realizaram reações de aza-Claisen de anilina catalisada com 2 equivalentes de  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  e obtiveram rendimento máximo de 66% durante 2 horas de reação em tubo selado. Esses resultados assemelham-se aos alcançados neste trabalho, uma vez que o tempo de reação utilizado foi de 45 minutos e rendimento de 36 a 45%, que representa aproximadamente metade do rendimento obtido em 2 horas.

O espectro de massas e  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ -RMN confirmaram a realização da reação para **2a**, pois espectro de  $^1\text{H}$ -RMN não apresentou os sinais típicos dos hidrogênios aromáticos *p*-substituídos, uma vez que o grupo alil foi rearranjado. O sinal de hidrogênio referente ao  $\text{CH}_2$  alifático apresentou sinal em 3,25 ppm, demonstrando que está mais protegido devido a ligação carbono-carbono quando comparado a este mesmo sinal de hidrogênio na molécula *N*-alilada onde a ligação estava entre nitrogênio-carbono. Há também a presença do hidrogênio alílico (5,91 ppm) e vinílicos (5,05-5,18 ppm) (apêndice 11 – página 109). Como esperado, foram obtidos os 9 sinais correspondentes aos átomos de carbono (apêndice 12 – página 110). O espectro de massas apresentou o íon molecular de  $m/z$  167. A distribuição característica dos isótopos estáveis de cloro, que são distinguidos por duas unidades de massa e apresentados na proporção de 75% (isótopo 35) e 25%

(isótopo 37), é observada no espectro obtido através do íon  $m/z$  169. A presença e a proporção do sinal deste em relação ao íon molecular de  $m/z$  167 corrobora com a afirmação da presença do átomo de cloro na molécula. O fragmento de  $m/z$  152 mostra a perda na amina o que demonstra o grupo alila foi rearranjado,  $m/z$  132 foi gerado a partir da perda do átomo de Cl e  $m/z$  117 é atribuído a perda do cloro e da amina presente na estrutura (apêndice 13 – página 111).



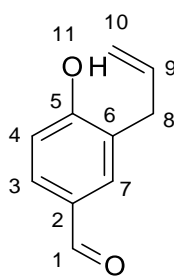
**2a:** Óleo roxo.  $^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz,  $\delta$  = ppm, TMS): 3,25 (d,  $J$  = 6,1 Hz, 2H, H-8), 3,65 (sl, 2H, H-1), 5,06-5,18 (m, 2H, H-10), 5,91 (ddt,  $J$  = 16,3, 10,2, 6,1 Hz, 1H, H-9), 6,58-6,61 (m, 1H, H-7), 7,00-7,02 (m, 2H, H-6/4).  $^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz,  $\delta$  = ppm, TMS): 36,2 (C-8), 116,7 (C-10), 116,8 (C-7), 123,3 (C-3), 125,6 (C-5), 127,3 (C-6), 129,8 (C-4), 135,0 (C-9), 143,4 (C-2). EMBR:  $m/z$  (int. rel.) = 167  $[\text{M}]^+$  (100), 152 (45), 132 (80), 117 (80).

Conforme explorado e discutido extensamente no trabalho publicado por Nascimento e Fernandes (2017), a obtenção do produto almejado *N*-alilado mesmo após máxima otimização do processo, é sempre acompanhado pela presença do subproduto *N,N*-dialilado. Avaliando os resultados que apresentam máximo rendimento total do composto *N*-alilado, é possível verificar que este rendimento é considerado baixo e necessita de etapa adicional de purificação devido a presença do subproduto *N,N*-dialilado, ocasionando perda do produto de interesse. Por conseguinte, a reação de Claisen também apresenta rendimentos baixos e novamente é necessária a etapa de purificação, resultando em mais perdas do produto alvo. Portanto, os baixos rendimentos apresentados pelas reações e as adicionais etapas de purificação inviabilizaram obter os produtos finais diidroindólicos planejados neste trabalho.

A metodologia utilizada no rearranjo de Claisen em micro-ondas para obter os compostos alil-fenil éteres almejados seguiram metodologia de Correa *et al.* (2016) e

os resultados estão reunidos na tabela 4 descrita na metodologia (rendimento de 37-69% para **2b** e 67% para **2c**). A metodologia referenciada foi a diretriz para as reações deste trabalho e os resultados obtidos assemelham-se aos já publicados por Correa *et al.* (2016) de 48% para 5-alil-4-hidroxi-3-metoxibenzaldeído e de 50% para 3-alil-4-hidroxibenzaldeído.

Para o composto **2b**, a reação foi confirmada através dos espectros de massas e de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ -RMN. Não foi possível observar no espectro de  $^1\text{H}$ -RMN os sinais característicos dos hidrogênios aromáticos *p*-substituídos, devido ao rearranjo intramolecular do grupo alílico. Houve deslocamento dos sinais dos hidrogênios alifáticos do grupo alil para 3,48 ppm, o que representa que os hidrogênios estão mais protegidos devido a nova ligação carbono-carbono. O sinal de hidrogênio (9,84 ppm) representa o hidrogênio desprotegido do grupo aldeído e observa-se também os sinais dos hidrogênios alílico (5,98-6,07 ppm) e (5,15-5,21 ppm) vinílicos (apêndice 14 – página 112). O espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN expressa os 9 sinais correspondentes aos átomos de carbono presentes na molécula (apêndice 15 – página 113). O espectro de massas apresentou o íon molecular esperado de  $m/z$  162 e modificação do perfil de fragmentação (apêndice 16 – página 114), sugerindo, por técnica diferente, que o rearranjo intramolecular ocorreu de forma esperada.

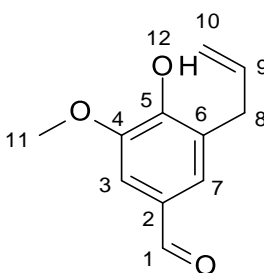


**2b**: Sólido branco.  $^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz,  $\delta$  = ppm, TMS): 3,48 (d,  $J$  = 6,4 Hz, 2H, H-8), 5,15-5,21 (m, 2H, H-10), 5,98-6,07 (m, 1H, H-9), 6,94-6,97 (m, 1H, H-4), 7,67-7,70 (m, 2H, H-3/7), 9,84 (s, 1H, H-1).  $^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz,  $\delta$  = ppm, TMS): 34,6 (C-8), 116,1 (C-4), 117,2 (C-10), 126,6 (C-6), 129,9 (C-2), 131,7 (C-3), 135,4 (C-7), 160,1 (C-5), 191,4 (C-1). EMBR:  $m/z$  (int. rel.) = 162  $[\text{M}]^+$  (100), 161 (80), 133 (30), 105 (25).

Da mesma forma para o composto **2c** a caracterização foi realizada. O espectro de  $^1\text{H}$ -RMN (apêndice 17 – página 115) apresentou deslocamentos



característicos os quais confirmam que houve a ligação carbono-carbono que caracteriza o rearranjo de Claisen esperado, conforme explicado detalhadamente no intermediário anterior. Como previsto, no espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN identifica-se os sinais referentes aos 11 carbonos (apêndice 18 – página 116) e o espectro de massas demonstra o íon molecular  $m/z$  192 com alteração do perfil de fragmentação (apêndice 19 – página 117).



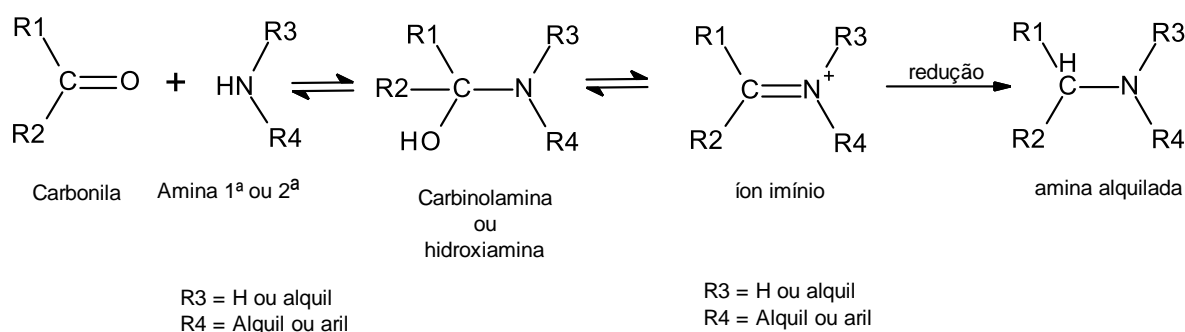
**2c:** Sólido levemente amarelado.  $^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz,  $\delta$  = ppm, TMS): 3,47 (dt,  $J$  = 6,6, 1,3 Hz, 2H, H-8), 3,97 (s, 3H, H-11), 5,09-5,15 (m, 2H, H-10), 5,94-6,07 (m, 1H, H-9), 6,27 (sl, 1H, H-12), 7,29 (m, 2H, H-3/7), 9,81 (s, 1H, H-1).  $^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz,  $\delta$  = ppm, TMS): 33,5 (C-8), 56,3 (C-11), 107,0 (C-3), 116,4 (C-10), 126,1 (C-2), 128,1 (C-6), 129,1 (C-7), 135,6 (C-9), 146,9 (C-5), 149,4 (C-4), 191,2 (C-1). EMBR:  $m/z$  (int. rel.) = 192  $[\text{M}]^+$  (100), 131 (38), 103 (30).

As aminas e derivados de aminas apresentam atividades biológicas importantes e reservam atenção especial na química orgânica. Estão presentes em moléculas biológicas importantes como histamina, aminoácidos, ácidos nucleicos, em moléculas naturais e sintéticas como alcalóides e também estrutura base para síntese de polímeros como o nylon (ABDEL-MAGID; MEHRMAN, 2006; MAHDY; WEBSTER, 2017).

Dada a sua importância, são conhecidos em síntese orgânica muitos métodos gerais de preparações de aminas, como a redução dos grupos funcionais nitro, ciano, carboxamida, por exemplo, que contém o átomo de nitrogênio; alquilação de amônia, aminas primárias e secundárias realizadas com halogenetos ou sulfonatos de alquila e a alquilação redutora (para aminas) ou aminação redutiva (para compostos carbonílicos). A reação de aminação redutiva ocorre entre aldeídos ou cetonas com amônia ou aminas primárias e secundárias na presença de agentes redutores originando nesta ordem, aminas primárias, secundárias e terciárias. A

reação ocorre primeiramente com a formação da carbinolamina ou hidroxiamina (figura 40), este intermediário passa pelo processo de desidratação, originando uma imina que também denominada base de Schiff ou, ainda, o íon imínio, que é oriundo da protonação da imina quando em meio levemente ácido a neutro. Com a ação dos agentes redutores, este íon é reduzido produzindo a amina alquilada (ABDEL-MAGID et al., 1996).

**Figura 40** – Reação de aminação redutiva.



O agente redutor, se adicionado no início da reação diretamente ao composto carbonilado e a amina, pode conduzir a aminação redutiva direta, onde não há a formação inicial da imina ou íon imínio e a escolha do agente redutor deve ser assertiva, uma vez que a redução da imina ou imínio deve ocorrer seletivamente à redução da carbonila, evitando assim a formação do álcool correspondente. Na reação de aminação redutiva indireta, ocorre primeiramente a formação do intermediário imina ou enamina e, em seguida, a adição do agente redutor e para esta etapa, o agente redutor não é tão crítico quanto na aminação redutiva direta (ABDEL-MAGID; MEHRMAN, 2006).

Nas reações de aminação redutiva podem ser utilizados reagentes redutores como triacetóxiboroidreto de sódio ( $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ ), denominado também de STAB-H, cianoborohidreto de sódio ( $\text{NaBH}_3\text{CN}$ ), borohidreto de sódio ( $\text{NaBH}_4$ ), ácido fórmico ( $\text{CH}_2\text{O}_2$ ) e a hidrogenação catalítica, entre outros. No entanto, alguns redutores apresentam certas limitações, por exemplo, o  $\text{NaBH}_4$  é um agente redutor não seletivo; o uso do ácido fórmico é limitado devido à alta temperatura empregada de 190 a 210 °C para que ocorra a reação; o  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  é altamente tóxico e seus subprodutos HCN e NaCN também apresentam toxicidade, apesar de conferir seletividade em determinados valores de pH e apresentar boa solubilidade em

solventes hidroxílicos e por último, a hidrogenação catalítica não deve ser escolhida se a molécula apresentar triplas ligações (ABDEL-MAGID; MEHRMAN, 2006; IGNATOVICH et al., 2008).

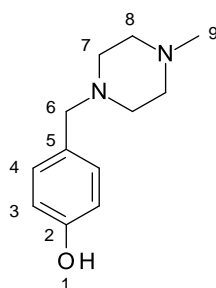
Diante do exposto, o STAB-H é um dos reagentes mais utilizados e sua preferência em reações de aminação redutiva é atribuída às condições de reação mais brandas e pela sua reatividade, apesar de ser pouco solúvel em solventes orgânicos e ser suscetível a umidade (BHATTACHARYYA et al., 2003; IGNATOVICH et al., 2008). O solvente também desempenha papel importante nesta reação, sendo que solventes polares apróticos como 1,2-dicloroetano, THF, acetonitrila e DMF, apresentaram rendimentos apreciáveis (ABDEL-MAGID; MEHRMAN, 2006).

O procedimento utilizado para as reações de aminação redutiva inicialmente seria baseado na metodologia de Ignatovich *et al.* (2008), no entanto, após algumas tentativas sem sucesso, optou-se em seguir a metodologia de Abdel-Magid *et al.* (1996). Neste trabalho, os resultados obtidos para as reações de aminação redutiva estão descritos na metodologia, tabela 4.

O método sintético utilizado por Moussa *et al.* (2010) para obtenção de compostos a partir da aminação redutiva de *orto*, *meta* e *para*-hidroxibenzaldeídos com piperazinas *p*-substituída, apresentou resultados de 83 a 85% de rendimento com o uso de agente redutor STAB-H em dicloroetano por 4 horas em temperatura ambiente com proporções estequiométricas semelhantes. Os resultados alcançados neste trabalho para metilpiperazina atingiram rendimentos entre 32 e 64% com o uso do mesmo agente redutor, solvente (THF) e tempo de reação (*overnight*) diferentes e indicando que é possível otimizar esta reação para obter composto com maior rendimento e menor tempo.

O composto **3b** foi caracterizado através das técnicas espectroscópicas de RMN e massas. No espectro de <sup>1</sup>H-RMN (apêndice 20 – página 118) verifica-se a presença dos sinais de hidrogênios característicos de anel aromático *p*-substituído (6,60 e 7,06 ppm), o sinal (2,53 ppm) representa os hidrogênios da piperazina e (2,30 ppm) da metila. O deslocamento dos hidrogênios benzílicos (3,48 ppm) confirmam o sucesso da reação e demonstram que não houve a redução do aldeído a álcool somente. Após aminação redutiva, o carbono no qual estes hidrogênios estão ligados possui conexão direta a um átomo de nitrogênio, o qual apresenta menor eletronegatividade quando comparado a eletronegatividade do átomo de

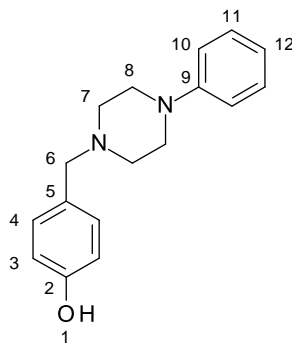
oxigênio, conseqüentemente, esses hidrogênios estão mais protegidos e apresentam o deslocamento descrito acima. Se a redução a álcool tivesse ocorrido, o carbono que possui esses hidrogênios estaria ligado a um átomo de oxigênio e devido a sua maior eletronegatividade, o deslocamento observado para esses hidrogênios seria maior por estarem menos protegidos. A integral dos hidrogênios confirma que a reação ocorreu de forma efetiva, pois demonstra proporcionalmente os hidrogênios na estrutura molecular e este racional é o mesmo para os demais compostos obtidos por aminação redutiva. No espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN foram obtidos os 8 sinais de carbono da molécula (apêndice 21 – página 119) e o espectro de massas apresentou o íon molecular esperado  $m/z$  206 (apêndice 22 – página 120).



**3b:** Sólido branco.  $^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz,  $\delta$  = ppm, TMS): 2,30 (s, 3H, H-9), 2,53 (sl, 8H, H-7/8), 3,48 (s, 2H, H-6), 6,60 (d,  $J$  = 8,3 Hz, 2H, H-4), 7,06 (d,  $J$  = 8,3 Hz, 2H, H-3).  $^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz,  $\delta$  = ppm, TMS): 45,8 (C-9), 52,1 (C-7), 54,8 (C-8), 62,3 (C-6), 115,5 (C-4), 127,5 (C-5), 131,0 (C-3), 155,9 (C-2). EMBR:  $m/z$  (int. rel.) = 206  $[\text{M}]^+$  (68), 148 (48), 135 (72), 107 (100), 99 (64), 70 (28), 56 (62).

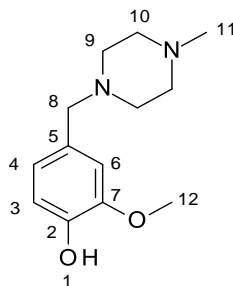
A aminação redutiva com fenilpiperazina e 4-hidroxibenzaldeído foi realizada por Zhong *et al.* (2016) com proporções estequiométricas similares à deste trabalho, mas por metodologia sintética distinta (ácido fórmico como agente redutor e aquecimento) e obteve rendimento de 40%, enquanto que a metodologia utilizada neste trabalho apresentou um rendimento muito baixo. Devido ao baixo rendimento da reação e conseqüente dificuldade de purificação, para o composto **4b**, a caracterização não pode ser completa e foram realizados apenas espectros de massas e  $^1\text{H}$ -RMN. No espectro de  $^1\text{H}$ -RMN, observa-se os sinais referentes a molécula alvo mesmo na presença de contaminantes. Foram detectados sinais (6,95 e 7,20-7,33 ppm) de hidrogênios de anel aromático *p*-substituído, (2,61 e 3,20 ppm) atribuídos aos hidrogênios benzílicos, (2,80-3,07 e 3,40 ppm) dos hidrogênios da

piperazina e (6,77-6,91; 6,95 e 7,20-7,33 ppm) dos hidrogênios do fenil que acoplam com os hidrogênios do anel aromático (apêndice 23 – página 121). No espectro de massas foi obtido o íon molecular  $m/z$  268 (apêndice 24 – página 122), porém observa-se que o espectro está impuro.



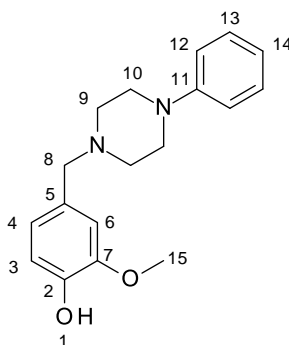
**4b:** Sólido branco.  $^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz,  $\delta$  = ppm, TMS): 2,61 (t,  $J$  = 4,8 Hz, 1H, H-6a), 2,80-3,07 (m, 4H, H-7), 3,18 (t,  $J$  = 4,8 Hz, 1H, H-6b), 3,40 (d,  $J$  = 12,5 Hz, 2H, H-8a), 3,68 (d,  $J$  = 12,5 Hz, 2H, H-8b), 6,77-6,91 (m, 1H, H-12), 6,95 (dd,  $J$  = 10,7, 8,1 Hz, 4H, H-3/10), 7,20-7,33 (m, 4H, H-4/11). EMBR:  $m/z$  (int. rel.) = 268  $[\text{M}]^+$  (31), 162 (32), 135 (42), 120 (100), 106 (56), 91 (14), 77 (45), 56 (45).

Para **3c** o rendimento alcançado foi de 30 a 74% e Kuhhorn, Hubner e Gmeiner (2011) publicaram o rendimento de 69%, utilizando o mesmo agente redutor e dicloroetano como solvente em 14 h. Pode-se concluir que os rendimentos foram semelhantes, mas não reproduzíveis para este trabalho devido a ampla faixa de resultados obtido, sugerindo que a reação pode ser otimizada em solvente dicloroetano e com menor tempo reacional. Os espectros de  $^1\text{H}$ -RMN,  $^{13}\text{C}$ -RMN e massas e foram obtidos. O espectro de  $^1\text{H}$ -RMN apresentou os sinais da molécula de interesse onde o sinal (3,86 ppm) são dos hidrogênios da metila do grupo metoxila, (6,75-6,87) são atribuídos aos hidrogênios anel aromático, (3,45 ppm) são dos hidrogênios benzílicos, (2,50 ppm) hidrogênios da metilpiperazina e (2,31 ppm) hidrogênios do substituinte metil da piperazina (apêndice 25 – página 123). O espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN demonstrou os 11 sinais dos carbonos presentes no composto (apêndice 26 – página 124) e o espectro de massas apresentou o íon molecular de  $m/z$  236 (apêndice 27 – página 125).



**3c:** Sólido branco.  $^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz,  $\delta$  = ppm, TMS): 2,31 (s, 3H, H-11), 2,50 (sl, 8H, H-9/10), 3,45 (s, 2H, H-8), 3,86 (s, 3H, H-12), 6,75-6,87 (m, 3H, H-3/4/6).  $^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz,  $\delta$  = ppm, TMS): 45,9 (C-11), 52,8 (C-9), 55,0 (C-10), 55,9 (C-12), 62,9 (C-8), 111,9 (C-6), 114,2 (C-3), 122,2 (C-4), 129,6 (C-5), 145,0 (C-7), 146,7 (C-2). EMBR:  $m/z$  (int. rel.) = 236  $[\text{M}]^+$  (100), 178 (38), 165 (65), 137 (98), 99 (96), 70 (30), 56 (59).

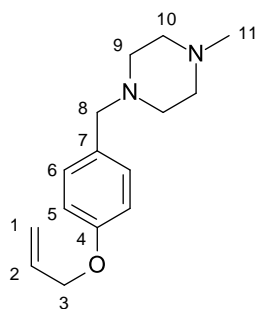
O composto **4c** obteve rendimento de 25% com a metodologia utilizada. Na literatura não foi possível localizar pelas plataformas de dados pesquisadas a síntese com deste aldeído com a fenilpiperazina, apenas metodologias com aldeídos e fenilpiperazinas substituídas. Labrie *et al.* (2007) publicou um trabalho com proporções estequiométricas semelhantes de agente redutor, aldeído e piperazina substituídos e solvente diclorometano por 18h de reação sob atmosfera de nitrogênio e obteve 100% de rendimento. A diferença entre os rendimentos pode ser atribuída às condições reacionais e reagentes utilizados em cada metodologia, no entanto, o foco deste trabalho não é otimizar demasiadamente os rendimentos, mas sintetizar as moléculas propostas com rendimentos aceitáveis. A síntese desse composto não apresentou pureza e quantidade suficiente para os demais testes de caracterização e somente o espectro de massas foi obtido. Este apresentou o íon molecular de  $m/z$  298 (apêndice 28 – página 126).



**4c**: Sólido branco. O produto não foi obtido com pureza suficiente para adequada caracterização por RMN. EMBR:  $m/z$  (int. rel.) = 298  $[M]^+$  (60), 165 (66), 137 (61), 120 (100), 106 (35), 77 (35), 56 (67).

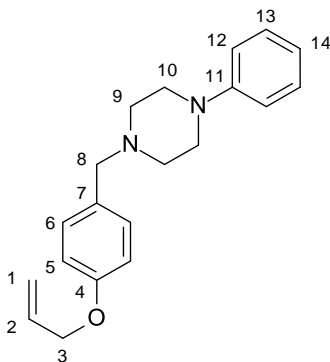
As moléculas obtidas através das reações de aminação redutiva entre **1b** e metilpiperazina ou fenilpiperazina, **1c** e metilpiperazina ou fenilpiperazina, **2b** e metilpiperazina ou fenilpiperazina e **2c** e metilpiperazina ou fenilpiperazina não foram localizadas nas plataformas de dados pesquisadas, sendo assim consideradas inéditas e não sendo possível comparar os rendimentos obtidos com a literatura. Portanto, para essas moléculas serão discutidos apenas os espectros obtidos.

O espectro de  $^1\text{H}$ -RMN obtido para **5b** apresentou os sinais (4,52 ppm) dos hidrogênios alifáticos, (6,05 ppm) alílico, (5,28 e 5,41 ppm) vinílicos, sinais (6,87 e 7,22 ppm) típicos de anel aromático *p*-substituído, (3,44 ppm) dos hidrogênios benzílicos, (2,45 ppm) dos hidrogênios da piperazina e (2,27 ppm) do metil (apêndice 29 – página 127). Conforme esperado, o espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN demonstra 11 sinais dos carbonos (apêndice 30 – página 128). O espectro de massas apresentou o íon molecular previsto de  $m/z$  246 conforme observado no apêndice 31 – página 129.



**5b**: Sólido branco.  $^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz,  $\delta$  = ppm, TMS): 2,27 (s, 3H, H-11), 2,45 (sl, 8H, H-9/10), 3,44 (s, 2H, H-8), 4,52 (dd,  $J$  = 3,9, 1,4 Hz, 2H, H-3), 5,28 (dd,  $J$  = 10,5, 1,4 Hz, 1H, H-1a), 5,41 (dd,  $J$  = 17,2, 1,4 Hz, 1H, H-1b), 6,05 (ddt,  $J$  = 17,2, 10,5, 5,3 Hz, 1H, H-2), 6,87 (d,  $J$  = 8,3 Hz, 2H, H-6), 7,22 (d,  $J$  = 8,3 Hz, 2H, H-5).  $^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz,  $\delta$  = ppm, TMS): 46,0 (C-11), 52,9 (C-9), 55,1 (C-10), 62,4 (C-8), 68,8 (C-3), 114,4 (C-1), 117,6 (C-2), 130,3 (C-6), 130,4 (C-5), 133,4 (C-7), 157,7 (C-4). EMBR:  $m/z$  (int. rel.) = 246  $[M]^+$  (99), 188 (49), 175 (74), 147 (60), 99 (100), 70 (34), 56 (67).

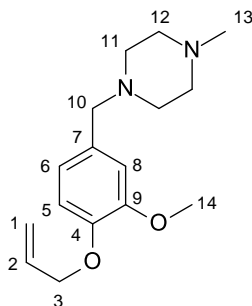
Para o composto **6b**, foi realizada a caracterização através dos espectro de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -RMN e massas. O espectro de  $^1\text{H}$ -RMN apresentou os sinais característicos descrito acima (hidrogênios alifáticos, alílico, vinílicos, sinais típicos de anel aromático *p*-substituído, benzílicos e da piperazina) e dos hidrogênios do fenil *N*-substituinte da piperazina (6,84-6,97 e 7,24-7,32 ppm) que acoplam com os hidrogênios do anel aromático (apêndice 32 – página 130). O espectro  $^{13}\text{C}$ -RMN comprova a presença dos 14 carbonos presentes na molécula (apêndice 33 – página 131) e o espectro de massas mostrou o íon molecular de  $m/z$  308 (apêndice 34 – página 132).



**6b**: Sólido branco.  $^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz,  $\delta$  = ppm, TMS): 2,60-2,65 (m, 4, H-9), 3,19-3,25 (m, 4H, H-10), 3,53 (s, 2H, H-8), 4,56 (dd,  $J$  = 3,9, 1,4 Hz, 2H, H-3), 5,32 (dd,  $J$  = 10,5, 1,4 Hz, 1H, H-1a), 5,45 (dd,  $J$  = 17,2, 1,4 Hz, 1H, H-1b), 6,05 (ddt,  $J$  = 17,2, 10,5, 5,3 Hz, 1H, H-2), 6,84-6,97 (m, H-5/12/14), 7,24-7,32 (m, H-6/13).  $^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz,  $\delta$  = ppm, TMS): 49,2 (C-9), 53,0 (C-10), 62,5 (C-8), 68,9 (C-3), 114,5 (C-5), 116,0 (C-12), 117,7 (C-14), 119,6 (C-1), 129,0 (C-13), 130,2 (C-11), 130,4 (C-2), 133,4 (C-6), 151,4 (C-7), 157,8 (C-4). EMBR:  $m/z$  (int. rel.) = 308  $[\text{M}]^+$  (98), 175 (100), 161 (61), 147 (54), 134 (35), 106 (30), 77 (16), 56 (57).

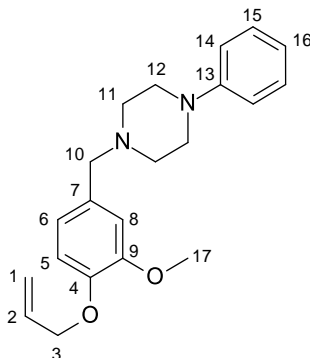
Os espectros comprovam que foi feita a caracterização para o composto **5c**. O espectro de  $^1\text{H}$ -RMN apresentou os sinais de hidrogênio esperados, sendo (2,48 ppm) dos hidrogênios da piperazina e (2,30 ppm) do metil, (3,45 ppm) dos hidrogênios benzílicos, sinais (5,28 e 5,41 ppm) do anel aromático, (3,89 ppm) do metil da metoxila, (4,60 ppm) dos hidrogênios alifáticos, (6,06 ppm) alílico e (5,28 e 5,41 ppm) vinílicos (apêndice 35 – página 133). O espectro  $^{13}\text{C}$ -RMN apresenta 14 carbonos (apêndice 36 – página 134) e o espectro de massas mostrou o íon molecular de  $m/z$  esperado de  $m/z$  276 (apêndice 37 – página 135).





**5c:** Sólido branco.  $^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz,  $\delta$  = ppm, TMS): 2,30 (s, 3H, H-13), 2,48 (sl, 8H, H-11/12), 3,45 (s, 2H, H-10), 3,89 (s, 3H, H-14), 4,60 (dd,  $J$  = 3,9, 1,4 Hz, 2H, H-3), 5,28 (dd,  $J$  = 10,5, 1,4 Hz, 1H, H-1a), 5,41 (dd,  $J$  = 17,2, 1,4 Hz, 1H, H-1b), 6,06 (ddt,  $J$  = 17,2, 10,5, 5,3 Hz, 1H, H-2), 6,81 (m, 2H, H-5/6), 6,90 (s, 1H, H-8).  $^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz,  $\delta$  = ppm, TMS): 45,9 (C-13), 52,9 (C-11), 55,0 (C-12), 56,0 (C-14), 62,7 (C-10), 69,9 (C-3), 112,7 (C-5), 113,0 (C-1), 117,9 (C-2), 121,3 (C-6), 131,0 (C-7), 133,5 (C-8), 147,1 (C-9), 149,3 (C-4). EMBR:  $m/z$  (int. rel.) = 276  $[\text{M}]^+$  (100), 205 (50), 99 (74), 70 (35), 56 (48).

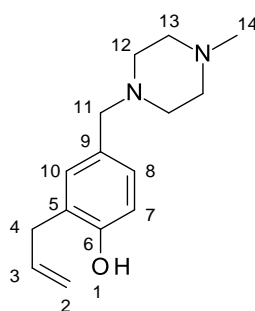
Os espectros do composto **6c** obtidos demonstram que a caracterização foi obtida. O espectro de  $^1\text{H}$ -RMN apresentou os sinais característicos dos hidrogênios já demonstrados acima (alifáticos, alílico, vinílicos, sinais do anel aromático, do metil da metoxila, dos hidrogênios benzílicos, dos hidrogênios da piperazina) e dos hidrogênios do fenil *N*-substituente da piperazina (6,84-6,90; 7,24-7,33; 6,92-6,99 ppm) que acoplam com os hidrogênios do anel aromático (apêndice 38 – página 136). O espectro  $^{13}\text{C}$ -RMN apresenta 17 carbonos (apêndice 39 – página 137) e o espectro de massas mostrou o íon molecular com  $m/z$  338 (apêndice 40 – página 138).



**6c:** Sólido branco.  $^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz,  $\delta$  = ppm, TMS): 2,60-2,65 (m, 4H, H-11), 3,20-3,25 (m, 4H, H-12), 3,53 (s, 2H, H-10), 3,91 (s, 3H, H-17), 4,63 (dd,  $J$

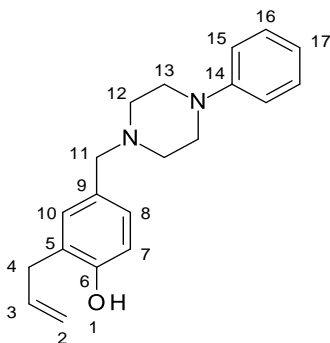
= 3,9, 1,4 Hz, 2H, H-3), 5,30 (dd,  $J = 10,5, 1,4$  Hz, 1H, H-1a), 5,43 (dd,  $J = 17,2, 1,4$  Hz, 1H, H-1b), 6,05 (ddt,  $J = 17,2, 10,5, 5,3$  Hz, 1H, H-2), 6,84-6,90 (m, 3H, H-5/14), 6,92-6,99 (m, 3H, H-6/8/16), 7,24-7,33 (m, 2H, H-15).  $^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz,  $\delta =$  ppm, TMS): 49,1 (C-11), 53,1 (C-12), 56,0 (C-17), 62,8 (C-10), 70,0 (C-3), 112,6 (C-5), 113,0 (C-1), 116,0 (C-14), 117,9 (C-16), 119,6 (C-2), 121,3 (C-6), 129,1 (C-15), 131,0 (C-7), 133,5 (C-8), 147,1 (C-9), 149,4 (C-13), 151,4 (C-4). EMBR:  $m/z$  (int. rel.) = 338  $[\text{M}]^+$  (20), 205 (28), 161 (37), 120 (100), 105 (33), 77 (44), 56 (39).

A caracterização foi completa para o composto **7b**, obtendo-se os espectros de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -RMN e massas. O espectro de  $^1\text{H}$ -RMN apresentou os sinais dos hidrogênios do grupo alila, sendo (3,38 ppm) correspondentes aos alifáticos, (6,01 ppm) alílico e (5,10-5,13 e 5,15-5,16 ppm) vinílicos. O sinal (3,43 ppm) é atribuído aos hidrogênios benzílicos, (2,48 ppm) dos hidrogênios da piperazina e (2,29 ppm) do metil (apêndice 41 – página 139). O espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN possui 13 sinais que são correlacionados com os átomos de carbono presentes na molécula (apêndice 42 – página 140). No espectro de massas observa-se a presença do íon molecular  $m/z$  246 (apêndice 43 – página 141) e também a modificação do perfil de fragmentação em relação ao mesmo composto O-alilado.



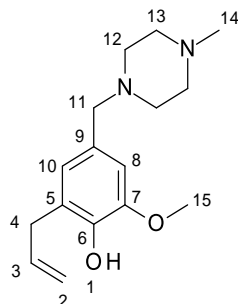
**7b**: Sólido branco.  $^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz,  $\delta =$  ppm, TMS): 2,29 (s, 3H, H-14), 2,48 (sl, 8H, H-12/13), 3,38 (d,  $J = 6,4$  Hz, 2H, H-4), 3,43 (s, 2H, H-11), 5,10-5,13 (m, 1H, H-2a), 5,15-5,16 (m, 1H, H-2b), 6,01 (ddt,  $J = 16,8, 10,3, 6,4$  Hz, 1H, H-3), 6,64 (d,  $J = 7,9$  Hz, 1H, H-7), 6,97-7,00 (m, 1H, H-8), 7,01 (s, 1H, H-10).  $^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz,  $\delta =$  ppm, TMS): 35,0 (C-4), 45,9 (C-14), 52,6 (C-12), 54,9 (C-13), 62,4 (C-11), 115,5 (C-7), 116,1 (C-2), 125,5 (C-5), 128,8 (C-8), 129,2 (C-9), 131,5 (C-10), 136,7 (C-3), 153,6 (C-6). EMBR:  $m/z$  (int. rel.) = 246  $[\text{M}]^+$  (100), 188 (60), 175 (75), 147 (83), 99 (86), 56 (60).

Foi realizada também a caracterização para o composto **8b**, embora nos espectros de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  -RMN sinais de contaminantes foram observados, provavelmente devido ao seu baixo rendimento e dificuldade de total purificação. De forma semelhante à descrita no espectro de  $^1\text{H}$ -RMN no composto anterior, os sinais de hidrogênio que caracterizam a molécula foram identificados (do grupo alila, alifáticos, alílico, vinílicos, benzílicos e piperazina) além dos hidrogênios (6,95 ; 7,08-7,15 e 6,87 ppm) do grupo fenil (*N*-substituente da piperazina) (apêndice 44 – página 142). O espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN possui 16 os sinais que caracterizam o composto (apêndice 45 – página 143). No espectro de massas observa-se a presença do íon molecular de  $m/z$  308 e perfil de fragmentação que difere do material de partida O-alilado (apêndice 46 – página 144).



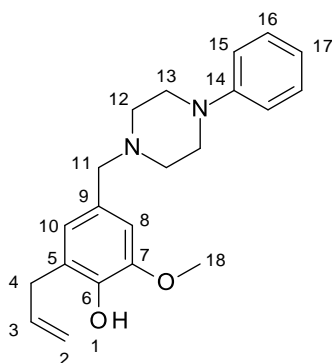
**8b**: Sólido branco.  $^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz,  $\delta$  = ppm, TMS): 2,61-2,68 (m, 4H, H-12), 3,19-3,27 (m, 4H, H-13), 3,42 (d,  $J$  = 6,4 Hz, 2H, H-4), 3,52 (s, 2H, H-11), 5,13-5,20 (m, 2H, H-2), 6,05 (m, 1H, H-3), 6,75 (d,  $J$  = 7,9 Hz, 1H, H-7), 6,87 (t,  $J$  = 7,4 Hz, H-17), 6,95 (d,  $J$  = 8,1 Hz, 2H, H-15), 7,08-7,15 (m, 2H, H-16), 7,24-7,32 (m, 2H, H-8/10).  $^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz,  $\delta$  = ppm, TMS): 35,1 (C-4), 49,0 (C-12), 53,0 (C-13), 62,5 (C-11), 115,6 (C-7), 116,1 (C-15), 116,4 (C-17), 119,7 (C-2), 125,3 (C-5), 128,9 (C-8), 129,1 (C-16), 129,6 (C-9), 131,5 (C-10), 136,5 (C-3), 151,3 (C-14), 153,5 (C-6). EMBR:  $m/z$  (int. rel.) = 308 [ $\text{M}$ ] $^+$  (10), 120 (100), 91 (30), 77 (32), 56 (25).

No espectro de massas do composto **7c**, foi obtido o íon molecular esperado, no entanto, não foi alcançada a purificação e posterior caracterização. O íon molecular apresentou  $m/z$  de 276 e outro perfil de fragmentação, sugerindo que o rearranjo possa ter ocorrido (apêndice 47 – página 145).



**7c:** Sólido branco. O produto não foi obtido com pureza suficiente para adequada caracterização por RMN. EMBR:  $m/z$  (int. rel.) = 276  $[M]^+$  (86), 205 (47), 177 (50), 99 (100), 70 (25), 56 (53).

O espectro de massas realizado para o composto **8c** demonstrou o íon molecular de  $m/z$  338 (apêndice 48 – página 146) embora exiba que há impurezas presentes. Não foi possível a caracterização completa deste intermediário dada a dificuldade da purificação.



**8c:** Sólido branco. O produto não foi obtido com pureza suficiente para adequada caracterização por RMN. EMBR:  $m/z$  (int. rel.) = 338  $[M]^+$  (70), 205 (72), 177 (43), 161 (75), 120 (100), 77 (25), 56 (45).

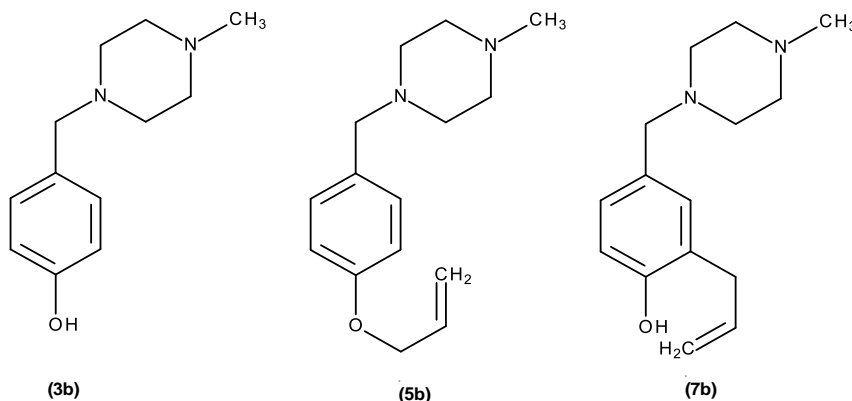
A etapa sintética de ciclização empregando-se iodo, com posterior eliminação do halogênio, para formação do anel benzofurânico foi realizada baseada em metodologia publicada (PANCOTE et al., 2009) em algumas tentativas com os intermediários **7b**, **8b**, **7c** e **8c**, porém, o insucesso da reação foi comprovado através de técnica espectroscópica ( $^1\text{H}$ -RMN). Diante desse resultado negativo para a conclusão dos compostos até a conclusão deste trabalho, estes não foram apresentados e discutidos.

## 5.2 Ensaio de *binding*

Durante o desenvolvimento da pesquisa, dificuldades sintéticas e de purificação impediram de obter os compostos planejados até a finalização deste trabalho. Diante desse desafio, os três primeiros intermediários obtidos com pureza adequada e completa caracterização foram testados em ensaio de *binding*.

O teste de *binding* foi realizado em parceria com o Prof. Dr. Cláudio Miguel da Costa-Neto (Departamento de Bioquímica e Imunologia – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP) conforme metodologia descrita em Corrêa *et al.* (2017b). Os intermediários testados em receptores H<sub>3</sub> e H<sub>4</sub> foram **3b**, **5b** e **7b** (figura 41).

**Figura 41** – Intermediários avaliados em teste de *binding*.



Os resultados obtidos de IC<sub>50</sub> (concentração inibitória, onde o ligante inibe a ligação da [<sup>3</sup>H]-histamina com o receptor em 50%) para os três intermediários apresentaram resultados superiores a 100 µM para ambos receptores, indicando que não houve afinidade entre o receptor e os ligantes.

Os ligantes avaliados são moléculas pequenas que assemelham-se a histamina, ligante endógeno dos receptores testados, por possuir um grupo polar básico ionizável, entretanto não apresentam os demais pontos essenciais na molécula para a afinidade com os receptores H<sub>3</sub> e H<sub>4</sub> e assim foi possível entender e explicar a ausência da afinidade pelos intermediários testados.

As moléculas que possuem afinidade pelo receptor H<sub>3</sub> e que se assemelham aos ligantes 2-metilbenzofurânicos da série LINS 01 planejados para este trabalho são o ABT-239 (figura 15) e os compostos LINS 01003 e 01005 (figura 26) já publicados na literatura. Conforme descrito na justificativa e de acordo com o modelo

farmacofórico proposto para ligantes não imidazólicos em receptores H<sub>3</sub>, esses compostos possuem em uma extremidade um grupo polar básico importante para a interação com o resíduo Asp114<sup>3,32</sup>, um grupo heteroaril ligados por um espaçante com distância adequada do grupo polar básico para a afinidade, além de conter na outra extremidade grupos ácido, básico, polares ou resíduo lipofílico. Os compostos finais seriam explorados principalmente quanto a importância da aromaticidade do núcleo heterociclo através do retroisosterismo, já que em núcleos benzofurânicos é sugerido que o oxigênio presente interage com o resíduo Trp189<sup>5,29</sup> no receptor H<sub>3</sub> (KISS; KESERŰ, 2016), no entanto, importante ressaltar que no planejamento dos compostos foram mantidas outras características básicas para que houvesse certa afinidade no receptor e assim, a influência da aromaticidade no heterociclo pudesse ser avaliada, porém, os intermediários testados não possuem o núcleo ciclizado, a principal característica a ser avaliada e também não há a presença de grupos ácido, básico, polares ou resíduo lipofílico na outra extremidade da molécula. Apenas o grupo polar básico piperazínico que é farmacofórico está presente nas estruturas.

O ligante LINS 01003 apresentou afinidade para o receptor H<sub>3</sub> ( $pK_i = 5,57 \pm 0,17$ ) (CORRÊA et al., 2017b) e é semelhante ao intermediário **7b**, sendo que este não possui o anel heterociclo fechado e seria o retroisóstero do composto citado, entretanto, o teste não demonstrou a afinidade deste ligante pelo receptor H<sub>3</sub>.

Ainda em relação ao receptor H<sub>3</sub>, a presença do grupo lipofílico metil como *N*-substituinte na porção piperazínica mostrou-se importante na afinidade e seletividade (CORRÊA et al., 2019). Os intermediários testados mantiveram esse substituinte, entretanto, a atividade não foi melhorada em virtude da presença deste.

Conforme já comprovado nas moléculas sintetizadas por Barbosa (2017), a presença de um grupo volumoso como substituinte na posição 5 do núcleo benzoheterociclo é importante para incrementar a atividade no receptor H<sub>3</sub> e nesses intermediários, esses substituintes não estão presentes. O substituinte alil e a hidroxila fenólica no anel aromático não proporcionaram vantagens na afinidade com o receptor.

Através dos resultados obtidos pelos intermediários no ensaio de *binding* realizado juntamente com a análise feita em relação a importância de cada porção da molécula para que esta tenha afinidade pelo receptor H<sub>3</sub>, é sugerido que para a série LINS 01, a presença do núcleo heteroaril ciclizado juntamente com

substituintes volumosos nesta porção e a presença da porção piperazínica farmacofórica com o *N*-substituinte metil, contribuem com para a afinidade frente ao receptor H<sub>3</sub>, já que os intermediários testados não apresentam essas características e não possuem afinidade. A avaliação e a compreensão quanto ao retroisosterismo para a afinidade não pode ser concluída, uma vez que os compostos benzofurânicos não foram concluídos e testados neste trabalho.

Analisando os intermediários quanto a semelhança ao composto protótipo que tem afinidade pelo receptor H<sub>4</sub>, o JNJ 7777120 (figura 21) pertencente a classe das indolcarboxamidas, e considerando o bioisosterismo que seria avaliado nos compostos planejados a partir das moléculas LINS 01003 e 01005, os intermediários testados possuem a piperazina *N*-substituída com o grupo metil que de acordo com estudos de REA, compõem a porção básica polar protonável em pH fisiológico, farmacofórica para a afinidade com o receptor através da interação com o resíduo Asp94<sup>3,32</sup> (ENGELHARDT et al., 2013). O *N*-substituinte alquil presente na piperazina auxilia no incremento da afinidade (JABLONOWSKI et al., 2003), entretanto, apenas essa característica nos intermediários não foram suficientes para demonstrar alguma afinidade pelo receptor H<sub>4</sub>.

Diversos compostos já publicados na literatura apresentam o nitrogênio como heteroátomo no núcleo aromático e é proposto que haja interação deste com o resíduo Glu182<sup>5,46</sup> (ENGELHARDT et al., 2013). Bioisósteros da classe das indolcarboxamidas foram avaliados quanto a afinidade para o receptor H<sub>4</sub> e foi evidenciado que o núcleo benzofurano diminuiu a afinidade pelo receptor em cerca de 100 vezes (ENGELHARDT et al., 2012). Os resultados obtidos por Corrêa *et al.* (2015) já sugeriam que nitrogênio como heteroátomo possivelmente aumentaria a afinidade pelo receptor H<sub>4</sub> pelo fato de que o oxigênio presente nos compostos benzodihidrofurânicos avaliados não interage com o resíduo em questão. Os intermediários testados não apresentam esse átomo de nitrogênio que formaria o núcleo heteroaril, contribuindo como um ponto de interação importante e também não possuem o núcleo heteroaromático ciclizado, para avaliar se a afinidade do núcleo benzofurano invertido no receptor seria melhorada.

De acordo com Jablonowski *et al.* (2003) em seu trabalho publicado, é sugerido que a presença da carbonila e também do átomo de cloro como substituinte do núcleo indólico aumenta a afinidade pelo receptor H<sub>4</sub> no arcabouço das indolcarboxamidas. Nos intermediários avaliados não há a presença dos grupo

citados acima, entretanto, os resultados de baixa afinidade apresentada não deve atribuída somente pela ausência desses grupos, pois compostos sem a presença da carbonila também apresentaram afinidades mensuráveis a este receptor (LEE-DUTRA et al., 2006) e no mesmo trabalho de Jablonowski *et al.* (2003), ligantes sem o átomo de cloro também apresentam relativa afinidade.

A falta de afinidade dos intermediários **3b**, **5b** e **7b** para o receptor H<sub>4</sub> já era prevista devido à ausência das características citadas acima que são importantes para que ocorra a interação com o receptor. Esperava-se que os compostos diidroindólicos apresentassem melhor afinidade devido a semelhança aos compostos indólicos, mas estes não tiveram a síntese concluída para avaliação ainda neste trabalho.



## 6 CONCLUSÕES

Diante dos resultados apresentados, pode-se concluir que foram sintetizados 18 intermediários. Dentre os compostos sintetizados, foram obtidos com pureza e rendimento aceitáveis o total de 12 compostos, sendo que para estes a caracterização foi completa através de técnicas espectroscópicas e não foram obtidos com pureza adequada o total de 6 compostos.

Foram avaliados em teste de *binding* 3 intermediários obtidos os quais não apresentaram afinidade apreciável pelos receptores H<sub>3</sub> e H<sub>4</sub>, entretanto, esses resultados auxiliaram na compreensão do conjunto de pontos de interação essenciais na série LINS01, como a presença do núcleo benzo-heterociclo com substituinte hidrofóbico adicional juntamente com a porção piperazínica e *N*-substituinte alquil para a afinidade no receptor H<sub>3</sub>. Para o receptor H<sub>4</sub> era esperado que os compostos diidroindólicos apresentassem afinidade mensurável, mas estes não foram avaliados.

A partir dos resultados apresentados para os 3 intermediários que não apresentaram afinidade pelos receptores H<sub>3</sub> e H<sub>4</sub> e observando os resultados já publicados de moléculas semelhantes a estas e também pelo nosso grupo de pesquisa, é importante que os compostos planejados futuramente para receptor H<sub>3</sub> apresentem o núcleo heteroaril ciclizado com substituinte volumoso e a porção piperazínica com *N*-substituinte alquil (*N*-metil ou *N*-alil) para melhor afinidade e para o receptor H<sub>4</sub> os compostos diidroindólicos devem ser avaliados, pois mostram-se promissores pela presença do nitrogênio no anel heteroaromático. O substituinte fenil não deve ser escolhido como *N*-substituinte da piperazina para este arcabouço da série LINS 01, uma vez que já está comprovado que este não contribui para a afinidade em ambos receptores.

## 7 REFERÊNCIAS

ABDEL-MAGID, A. F. et al. Reductive Amination of Aldehydes and Ketones with Sodium Triacetoxyborohydride. Studies on Direct and Indirect Reductive Amination Procedures 1. **J. Org. Chem.**, v. 61, n. 11, p. 3849–3862, 1996.

ABDEL-MAGID, A. F.; MEHRMAN, S. J. A review on the use of sodium triacetoxyborohydride in the reductive amination of ketones and aldehydes. **Org. Process. Res. Dev.**, v. 10, n. 5, p. 971–1031, 2006.

AKDIS, C. A.; SIMONS, F. E. R. Histamine receptors are hot in immunopharmacology. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 533, n. 1–3, p. 69–76, 2006.

AMIN, K. The role of mast cells in allergic inflammation. **Respir. Med.**, v. 106, n. 1, p. 9–14, 2012.

ANDALOUSSI, M. et al. A novel series of histamine H4 receptor antagonists based on the pyrido [3 ,2- d] pyrimidine scaffold: Comparison of hERG binding and target residence time with PF-3893787. **ACS Med. Chem. Lett.**, v. 23, n. 9, p. 2663–2670, 2013.

ARRANG, J. M.; GARBARG, M.; SCHWARTZ, J. C. Auto-inhibition of brain histamine release mediated by a novel class (H3) of histamine receptor. **Nature**, v. 302, n. 5911, p. 832–837, 1983.

AYALA, S. L. G. et al. Sequential amino-Claisen rearrangement/intramolecular 1,3-dipolar cycloaddition/reductive cleavage approach to the stereoselective synthesis of cis-4-hydroxy-2-aryl-2,3,4,5-tetrahydro-1(1H)-benzazepines. **Synlett**, v. 1, n. 14, p. 2275–2277, 2006.

BARBOSA, Á. J. R. **Síntese e avaliação de derivados do LINS 01003 potencialmente ligantes de receptores histaminérgicos H4**. 2017. 117f. Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de São Paulo, Diadema, 2017.

BAROCELLI, E.; BALLABENI, V. Histamine in the control of gastric acid secretion: A topic review. **Pharmacol. Res.**, v. 47, n. 4, p. 299–304, 2003.

BERTACCINI, G.; POLI, E.; CORUZZI, G. Histamine H<sub>2</sub> receptor antagonists and the cardiovascular system. **Pharmacol. Res.**, v. 28, n. 4, p. 301–316, 1993.

BHATTACHARYYA, S. et al. Polymer-supported triacetoxymethylborohydride: A novel reagent of choice for reductive amination. **Tetrahedron Lett.**, v. 44, n. 27, p. 4957–4960, 2003.

BRUNTON, L. L. et al. **Goodman & Gilman manual de farmacologia e terapêutica**. 1. ed. São Paulo: McGraw-Hill, 2010.

CAREY, F. A. **Química Orgânica**. 7. ed. Porto Alegre: AMGH Editora Ltda, 2011.

CELANIRE, S. et al. Histamine H<sub>3</sub> receptor antagonists reach out for the clinic. **Drug Discov. Today**, v. 10, n. 23/24, p. 1613–1627, 2005.

CORRÊA, M. F. **Síntese e avaliação de 1-(2-(2,3-diidrobenzofuril)metil)piperazinas potencialmente ligantes de receptores histaminérgicos H<sub>4</sub>**. 2015. 151f. Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de São Paulo, Diadema, 2015.

CORRÊA, M. F. et al. Factorial design study to access the “ green ” iodocyclization reaction of 2-allylphenols. **Green Process. Synth**, v. 5, n. 2, p. 145–151, 2016.

CORRÊA, M. F. et al. 1-[(2,3-Dihydro-1-benzofuran-2-yl) methyl]piperazines as novel anti-inflammatory compounds: Synthesis and evaluation on H<sub>3</sub>R / H<sub>4</sub>R. **Chem. Biol. Drug Des.**, v. 90, n. 2, p. 317–322, 2017a.

CORRÊA, M. F. et al. Pharmacological characterization of 5-Substituted 1-[(2,3-dihydro-1- benzofuran-2-yl)methyl]piperazines: novel antagonists for the histamine H<sub>3</sub> and H<sub>4</sub> receptors with anti-inflammatory potential. **Front. Pharmacol.**, v. 8, n. 11, p. 1–12, 2017b.

CORRÊA, M. F. et al. Pharmacological and SAR analysis of the LINS01 compounds at the human histamine H<sub>1</sub> , H<sub>2</sub> , and H<sub>3</sub> receptors. **Chem. Biol. Drug Des.**, v. 93, n. 1, p. 89–95, 2019.

CORRÊA, M. F.; FERNANDES, J. P. S. Histamine H<sub>4</sub> receptor ligands: Future applications and state of art. **Chem. Biol. Drug Des.**, v. 85, n. 4, p. 461–480, 2015.

CORRÊA, M. F.; FERNANDES, J. P. S. Targeting the Histamine H4 Receptor: Future Drugs for Inflammatory Diseases. **Curr. Org. Chem.**, v. 22, p. 1–10, 2018.

COWART, M. et al. A new class of potent non-imidazole H3 antagonists: 2-aminoethylbenzofurans. **ACS Med. Chem. Lett.**, v. 14, n. 3, p. 689–693, 2004.

DU, Z. et al. Catalyst-free and highly selective N,N-diallylation of anilines in aqueous phase. **J. Chem.**, v. 2013, n. 1, p. 1–6, 2013.

ELLENBROEK, B. A.; GHIABI, B. The other side of the histamine H3 receptor. **Trends Neurosci.**, v. 37, n. 4, p. 191–199, 2014.

ENGELHARDT, H. et al. Detailed structure e activity relationship of indolecarboxamides as H4 receptor ligands. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 54, p. 660–668, 2012.

ENGELHARDT, H. et al. Bispyrimidines as Potent Histamine H4 Receptor Ligands: Delineation of Structure – Activity Relationships and Detailed H4 Receptor Binding Mode. **J. Med. Chem.**, v. 56, p. 4264–4276, 2013.

FENG, Z.; HOU, T.; LI, Y. Docking and MD study of histamine H4R based on the crystal structure of H1R. **J. Mol. Graph. Model.**, v. 39, p. 1–12, 2013.

FERNANDES, J. P. S. et al. Optimization of the ultrasound-assisted synthesis of allyl 1-naphthyl ether using response surface methodology. **Ultrason. Sonochem.**, v. 18, p. 489–493, 2011.

FREITAS, J. J. R. et al. Rearranjos de claisen mais usados em síntese orgânica: Uma revisão. **Rev. Virtual Quim.**, v. 9, n. 4, p. 1597–1657, 2017.

HANCOCK, A. A. et al. Antiobesity effects of A-331440, a novel non-imidazole histamine H3 receptor antagonist. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 487, p. 183–197, 2004.

HIERSEMANN, M.; NUBBEMEYER, U. **The Claisen rearrangement: methods and applications**. 1. ed. Wiley-VCH: Weinheim, 2007.

HU, W.; CHEN, Z. The roles of histamine and its receptor ligands in central nervous system disorders: An update. **Pharmacol. Ther.**, v. 175, p. 116–132, 2017.

HUANG, H. et al. Molecular regulation of histamine synthesis. **Front. Immunol.**, v. 9, n. 6, p. 1–7, 2018.

IGNATOVICH, J. et al. Synthesis of functionalized benzyl amines by the reductive alkylation of heterocyclic and heteroaromatic amines with arylaldehydes and preparation of the intermediates for new synthetic biomolecules. **Arkivoc**, v. 2008, n. ix, p. 42–51, 2008.

JABLONOWSKI, J. A. et al. The First Potent and Selective Non-Imidazole Human Histamine H4 Receptor Antagonists. **J. Med. Chem.**, v. 46, n. 19, p. 3957–3960, 2003.

JEMIMA, E. A.; PREMA, A.; THANGAM, E. B. Functional characterization of histamine H4 receptor on human mast cells. **Mol. Immunol.**, v. 62, p. 19–28, 2014.

KISS, R.; KESERŰ, G. M. Structure-based discovery and binding site analysis of histamine receptor ligands Review : Structure-based discovery and binding site analysis of histamine receptor ligands. **Expert Opin. Drug Discov.**, v. 11, n. 12, p. 1165–1185, 2016.

KOLLB-SIELECKA, M. et al. The European Medicines Agency review of pitolisant for treatment of narcolepsy: summary of the scientific assessment by the Committee for Medicinal Products for Human Use. **Sleep Med.**, v. 33, n. 2017, p. 125–129, 2017.

KOLLMEIER, A. P. et al. A Phase 2a Study of Toreforant, a Histamine H4 Receptor Antagonist, in Eosinophilic Asthma. **Ann. Allergy Asthma Immunol.**, v. 121, n. 5, p. 568–574, 2018.

KUHHORN, J.; HUBNER, H.; GMEINER, P. Bivalent Dopamine D2 Receptor Ligands : Synthesis and Binding Properties. **J. Med. Chem.**, v. 54, p. 4896–4903, 2011.

LABRIE, P. et al. In vitro activity of novel dual action MDR anthranilamide modulators with inhibitory activity on CYP-450 (Part 2). **Bioorg. Med. Chem.**, v. 15, p. 3854–3868, 2007.

LEE-DUTRA, A. et al. Identification of 2-arylbenzimidazoles as potent human

histamine H4 receptor ligands. **ACS Med. Chem. Lett.**, v. 16, n. 23, p. 6043–6048, 2006.

LEMKE, T. L. et al. **Foye's Principles of medicinal chemistry**. 7. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2012.

LEURS, R. et al. **Histamine**. 8. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2012.

LIU, W. L. Histamine H4 receptor antagonists for the treatment of inflammatory disorders. **Drug. Discov. Today**, v. 19, n. 8, p. 1222–1225, 2014.

LOVENBERG, T. W. et al. Cloning and Functional Expression of the Human Histamine H3 Receptor. **Mol. Pharmacol.**, v. 55, n. 6, p. 1101–1107, 1999.

MAHDY, A. M.; WEBSTER, N. R. Histamine and antihistamines. **Anaesth. Intensive Care Med.**, v. 241, p. 321–331, 2017.

MAJUMDAR, K. C. et al. Studies in amine oxide rearrangement: Meisenheimer rearrangement of m-substituted tertiary amine oxides. **Indian J. Chem. B**, v. 45, n. 3, p. 719–725, 2006.

MAJUMDAR, K. C. et al. Recent advances in the Aza-Claisen rearrangement. **Synthesis**, n. 13, p. 2117–2142, 2009.

MAJUMDAR, K. C.; ALAM, S.; CHATTOPADHYAY, B. Catalysis of the Claisen rearrangement. **Tetrahedron**, v. 64, n. 4, p. 597–643, 2008.

MANDAL, D. K. **Sigmatropic Rearrangements 2: [i , j] Shifts**. Amsterdam: Elsevier, 2018.

MARSON, C. M. Targeting the histamine H4 receptor. **Chem. Rev.**, v. 111, n. 11, p. 7121–7156, 2011.

MARTÍN-CASTRO, A. M.; TORTOSA, M. **Claisen Rearrangements**. Amsterdam: Elsevier, 2014. v. 5

MOUSSA, I. A. et al. Design, Synthesis, and Structure-Affinity Relationships of Regioisomeric N-Benzyl Alkyl Ether Piperazine Derivatives as  $\sigma$ -1 Receptor Ligands. **J. Med. Chem.**, v. 53, n. 16, p. 6228–6239, 2010.

MUKHERJEE, V.; YADAV, T. Conformational study of neutral histamine monomer and their vibrational spectra. **SPECTROCHIM ACTA A**, v. 165, p. 167–175, 2016.

NAKAMURA, T. et al. Molecular cloning and characterization of a new human histamine receptor, HH4R. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 279, n. 2, p. 615–620, 2000.

NASCIMENTO, L. F. S.; FERNANDES, J. P. S. Factorial study to assess an ultrasonic methodology for the allylation of 4-chloroaniline. **Green Process. Synth**, v. 6, n. 2, p. 203–209, 2017.

NIETO-ALAMILLA, G. et al. The Histamine H3 Receptor: Structure, Pharmacology, and Function. **Mol. Pharmacol.**, v. 90, n. 5, p. 649–673, 2016.

OHSAWA, Y.; HIRASAWA, N. The Role of Histamine H1 and H4 Receptors in Atopic Dermatitis: From Basic Research to Clinical Study. **Allergol. Int.**, v. 63, n. 4, p. 533–542, 2014.

PAIVA, T. B.; TOMINAGA, M.; PAIVA, A. C. M. Ionization of histamine, N-acetylhistamine, and their iodinated derivatives. **J. Med. Chem.**, v. 13, n. 4, p. 689–692, 1970.

PANCOTE, N. G. et al. Simple and Efficient Access to 3-Ethoxycarbonylpyrroles, Benzofurans, and Naphthofurans. **Synthesis**, v. 23, p. 3963–3966, 2009.

PANULA, P. et al. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. XCVIII. Histamine Receptors. **Pharmacol .Rev.**, v. 67, n. 3, p. 601–655, 2015.

PANULA, P.; NUUTINEN, S. The histaminergic network in the brain: Basic organization and role in disease. **Nat. Rev. Neurosci.**, v. 14, n. 7, p. 472–487, 2013.

PARSONS, M. E.; GANELLIN, C. R. Histamine and its receptors. **Br. J. Pharmacol.**, v. 147, n. SUPPL. 1, p. 127–135, 2006.

PASSANI, M. B.; BLANDINA, P. Histamine receptors in the CNS as targets for therapeutic intervention. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 32, n. 4, p. 242–249, 2011.

POZZOLI, C. et al. Effect of histamine H4 receptor ligands on cholinergic

neurotransmission of the rat duodenum. **J .Inflamm. Res.**, v. 58 Suppl 1, n. 2009, p. 59–60, 2009.

SADEK, B. et al. Histamine H3 receptor as a potential target for cognitive symptoms in neuropsychiatric diseases. **Behav. Brain. Res.**, v. 312, p. 415–430, 2016.

SANDER, K.; KOTTKE, T.; STARK, H. Histamine H3 Receptor Antagonists go to clinics. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 31, n. 12, p. 2163—2181, 2008.

SCHNEIDER, E. H.; SEIFERT, R. The histamine H4-receptor and the central and peripheral nervous system: A critical analysis of the literature. **Neuropharmacology**, v. 106, n. 5, p. 116–128, 2015.

SCHWARTZ, J. C. The histamine H3 receptor: From discovery to clinical trials with pitolisant. **Br. J. Pharmacol.**, v. 163, n. 4, p. 713–721, 2011.

SHAIKH, A. **Application of Microwaves in Sustainable Organic Synthesis**. Amsterdam: Elsevier Inc., 2017.

SIMONS, F. E. R.; SIMONS, K. J. Histamine and H1-antihistamines: Celebrating a century of progress. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 128, n. 6, p. 1139–1150.e4, 2011.

SIRACUSA, M. C. et al. Basophils and allergic inflammation. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 132, n. 4, p. 789–801, 2013.

SMITS, R. A. et al. Discovery of quinazolines as histamine H4 receptor inverse agonists using a scaffold hopping approach. **J. Med. Chem.**, v. 51, n. 24, p. 7855–7865, 2008.

SYED, Y. Y. Pitolisant: First Global Approval. **Drugs**, v. 76, n. 13, p. 1313–1318, 2016.

SZCZEPAŃSKA, K. et al. Optimization and preclinical evaluation of novel histamine H3 receptor ligands: Acetyl and propionyl phenoxyalkyl piperazine derivatives. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 26, n. 23–24, p. 6056–6066, 2018.

SZCZEPAŃSKA, K.; KUDER, K.; KIEĆ-KONONOWICZ, K. Histamine H3 Receptor Ligands in the Group of (Homo)piperazine Derivatives. **Curr. Med. Chem.**, v. 25, p.



1609–1626, 2018.

TABAREAN, I. V. Histamine receptor signaling in energy homeostasis. **Neuropharmacology**, v. 106, p. 13–19, 2015.

THAKKAR, M. M. Histamine in the regulation of wakefulness. **Sleep Med. Rev.**, v. 15, n. 1, p. 65–74, 2011.

THURMOND, R. L. et al. Clinical and Preclinical Characterization of the Histamine H4 Receptor Antagonist JNJ-39758979. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 349, n. 2, p. 176–184, 2014.

THURMOND, R. L. The histamine H4 receptor: from orphan to the clinic. **Front. Pharmacol.**, v. 6, n. 3, p. 1–12, 2015.

THURMOND, R. L. et al. Clinical Development of Histamine H4 Receptor Antagonists. **Handb. Exp. Pharmacol.**, v. 241, p. 301–320, 2017.

THURMOND, R. L.; GELFAND, E. W.; DUNFORD, P. J. The role of histamine H1 and H4 receptors in allergic inflammation: the search for new antihistamines. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 7, n. 1, p. 41–53, 2008.

TILIGADA, E. et al. Histamine H3 and H4 receptors as novel drug targets. **Expert. Opin. Investig. Drugs**, v. 18, n. 10, p. 1519–1531, 2009.

TIMMERMAN, H. ; VAN DER GOOT, H. **Histamine Receptors and their Ligands: Mechanisms and applications**. Amsterdam: Elsevier Ltd., 2009.

TYMOSHENKO, D. O. Microwave-Assisted Claisen and Aza-Claisen Rearrangements. **Mini Rev. Org. Chem.**, v. 5, n. 518, p. 85–95, 2008.

VAN DER GOOT, H.; TIMMERMAN, H. Selective ligands as tools to study histamine receptors. **Eur. J. Med Chem.**, v. 35, n. 1, p. 5–20, 2000.

VENABLE, J. D. et al. Preparation and Biological Evaluation of Indole, Benzimidazole, and Thienopyrrole Piperazine Carboxamides: Potent Human Histamine H4 Antagonists. **J. Med. Chem.**, v. 48, n. 26, p. 8289–8298, 2005.

VOLLHARDT, K. P. C.; SCHORE, N. E. **Química Orgânica: estrutura e função**. 4.

ed. Porto Alegre: Bookman, 2004.

WALTER, M.; STARK, H. Histamine receptor subtypes: a century of rational drug design. **Front. Biosci.**, n. 4, p. 461–488, 2012.

YAMAURA, K. et al. Expression of the histamine H4 receptor in dermal and articular tissues. **Life Sci.**, v. 92, n. 2, p. 108–113, 2013.

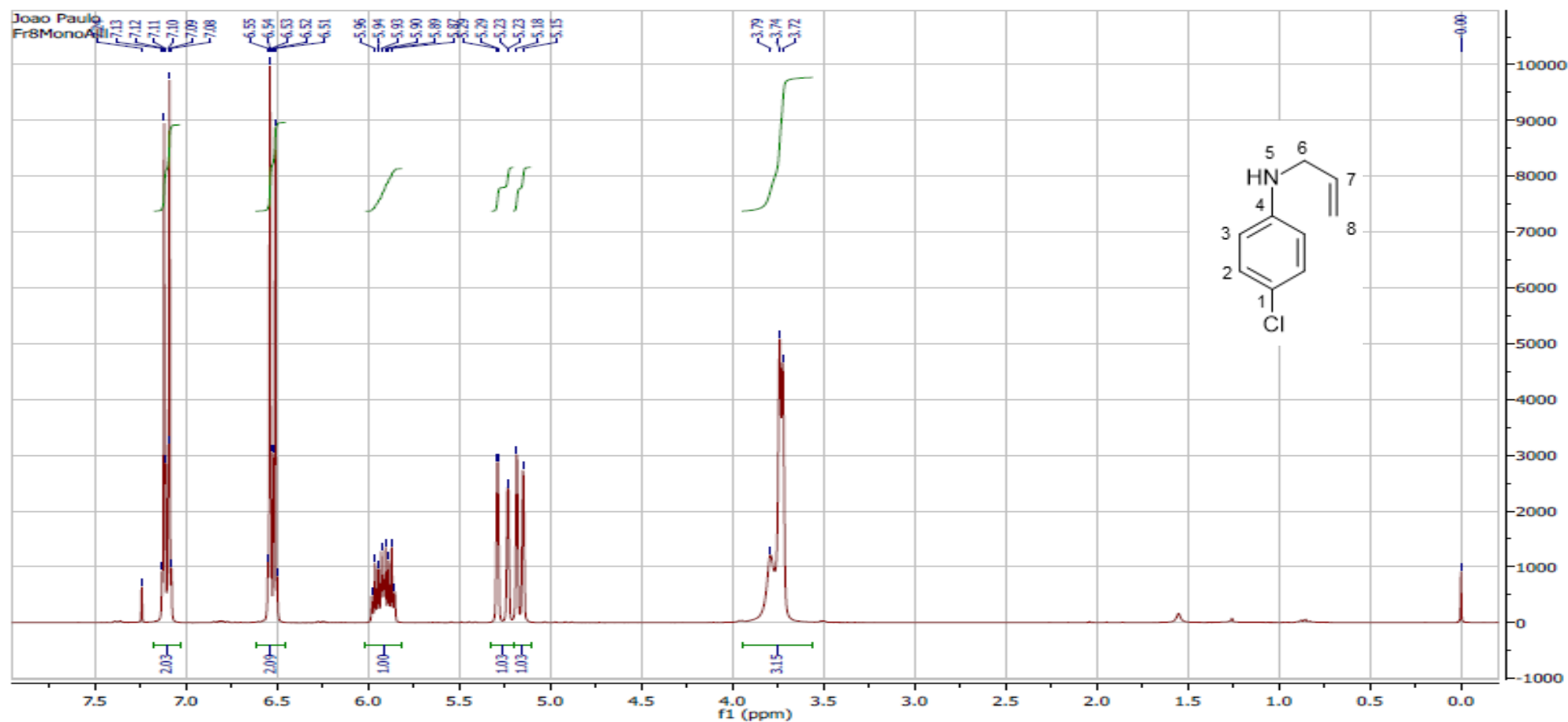
ZHANG, M.; THURMOND, R. L.; DUNFORD, P. J. The histamine H4 receptor: A novel modulator of inflammatory and immune disorders. **Pharmacol. Ther.**, v. 113, n. 3, p. 594–606, 2007.

ZHONG, H. et al. Combating P-glycoprotein-mediated multidrug resistance with 10-O-phenyl dihydroartemisinin ethers in MCF-7 cells. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 108, p. 720–729, 2016.

ZHOU, Z. et al. A concise synthesis of (±) -methoxyfumimycin ethyl ester. **J. Chem. Res.**, v. 38, n. 1, p. 378–380, 2014.

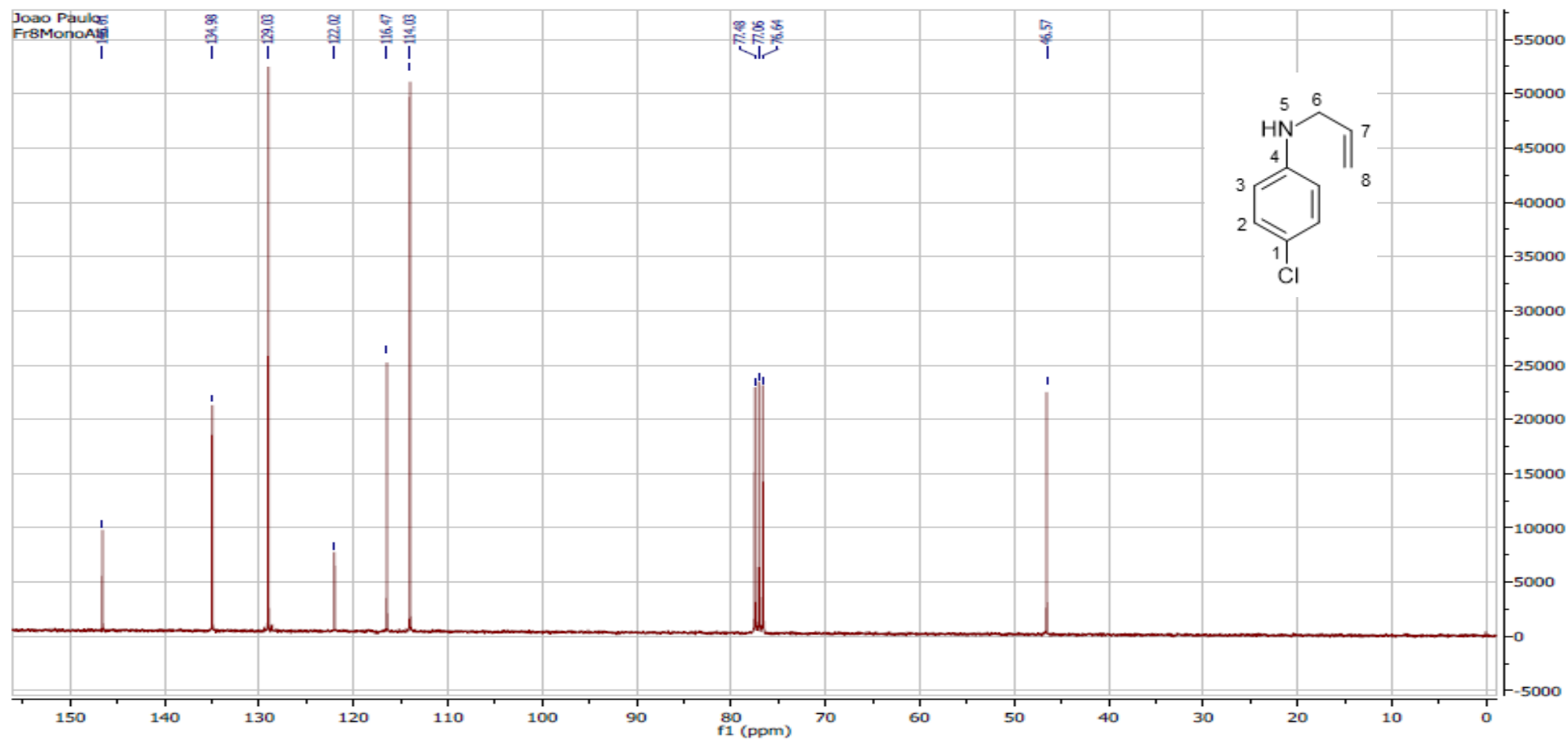
## **APÊNDICES**

## APÊNDICE 1



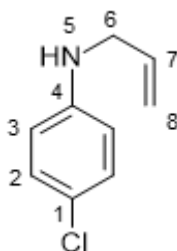
**1a1**: Óleo marrom.  $^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz,  $\delta$  = ppm, TMS): 3,73 (d,  $J$  = 5,3 Hz, 2H, H-6), 3,79 (sl, 1H, H-5), 5,17 (dd,  $J$  = 10,3, 1,3 Hz, 1H, H-8a), 5,26 (dd,  $J$  = 17,1, 1,5 Hz, 1H, H-8b), 5,87-5,96 (m, 1H, H-7), 6,51-6,55 (m, 2H, H-3), 7,08-7,24 (m, 2H, H-2).

## APÊNDICE 2

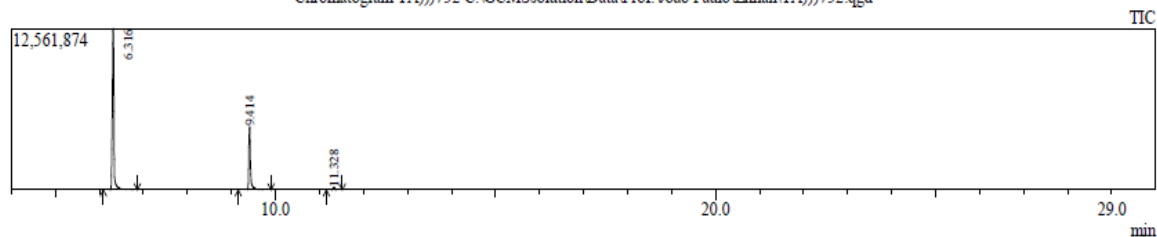


**1a1**: Óleo marrom.  $^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz,  $\delta$  = ppm, TMS): 46,6 (C-6), 114,0 (C-3), 116,5 (C-8), 122,0 (C-1), 129,0 (C-2), 135,0 (C-7), 146,6 (C-4).

# APÊNDICE 3



Chromatogram TA)))752 C:\GCMSsolution\Data\Prof. João Paulo\Lillian\TA)))752.qgd



Peak Report TIC									
Peak#	R.Time	I.Time	F.Time	Area	Area%	Height	Height%	A/H	Mark
1	6.316	6.092	6.867	34988627	70.93	12561874	70.91	2.79	MI
2	9.414	9.158	9.900	13702380	27.78	4920074	27.77	2.78	MI
3	11.328	11.158	11.517	639206	1.30	232157	1.31	2.75	MI
				49330213	100.00	17714105	100.00		

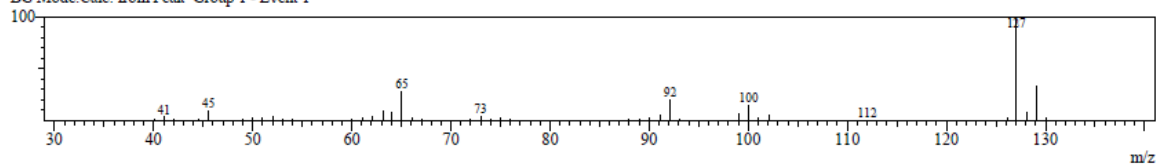
Spectrum

Line#1 R.Time:6.317(Scan#:279)

MassPeaks:66

RawMode:Averaged 6.308-6.325(278-280) BasePeak:127(3856598)

BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1

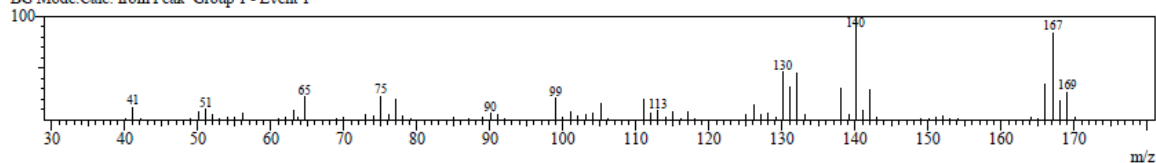


Line#2 R.Time:9.417(Scan#:651)

MassPeaks:96

RawMode:Averaged 9.408-9.425(650-652) BasePeak:140(548329)

BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1

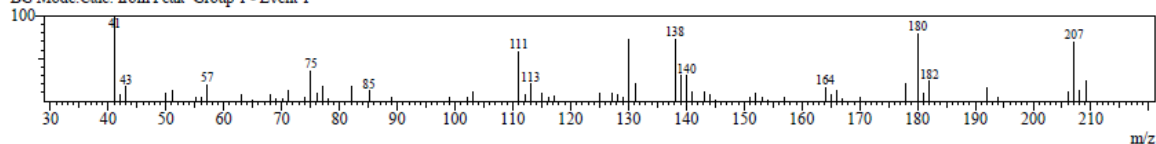


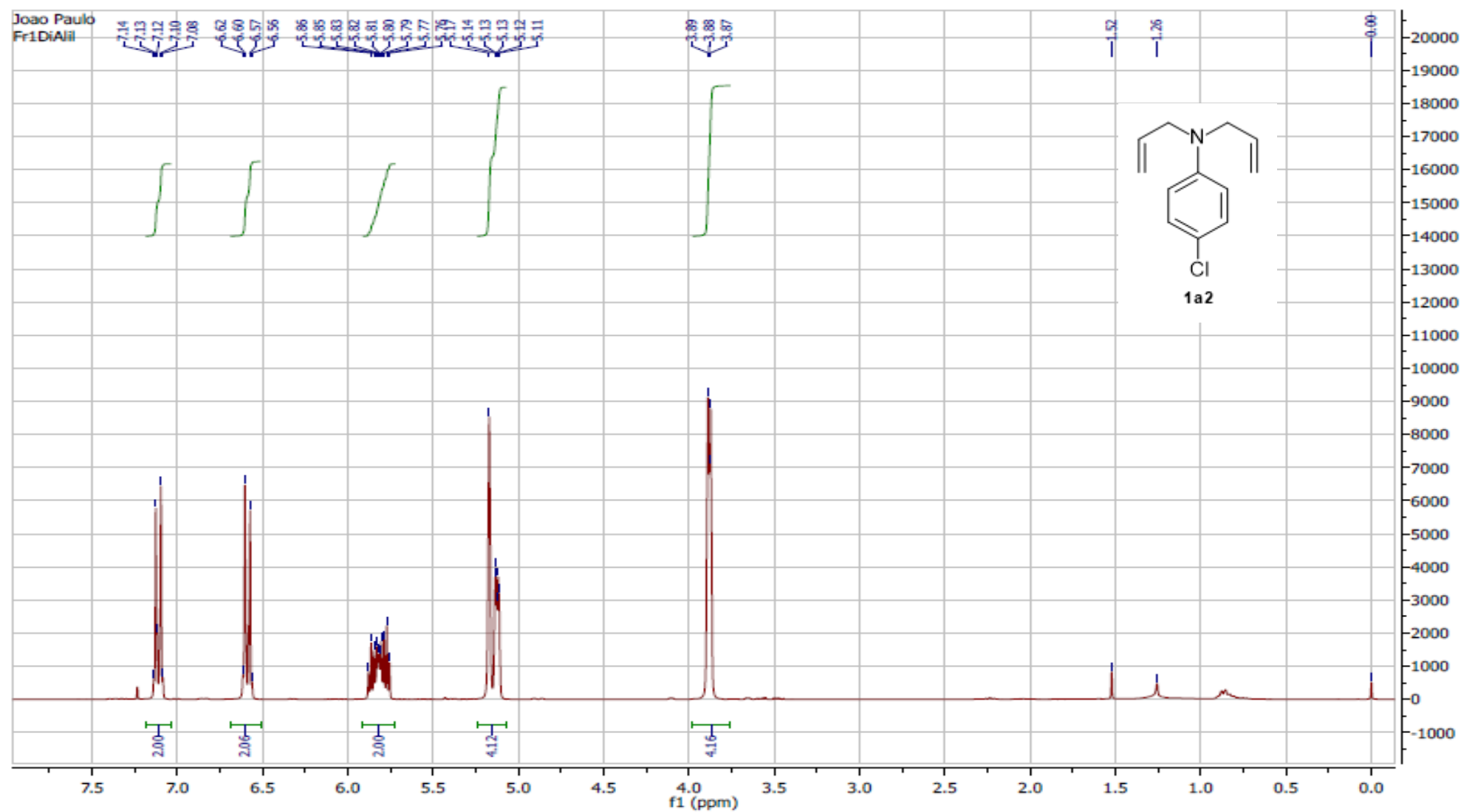
Line#3 R.Time:11.325(Scan#:880)

MassPeaks:64

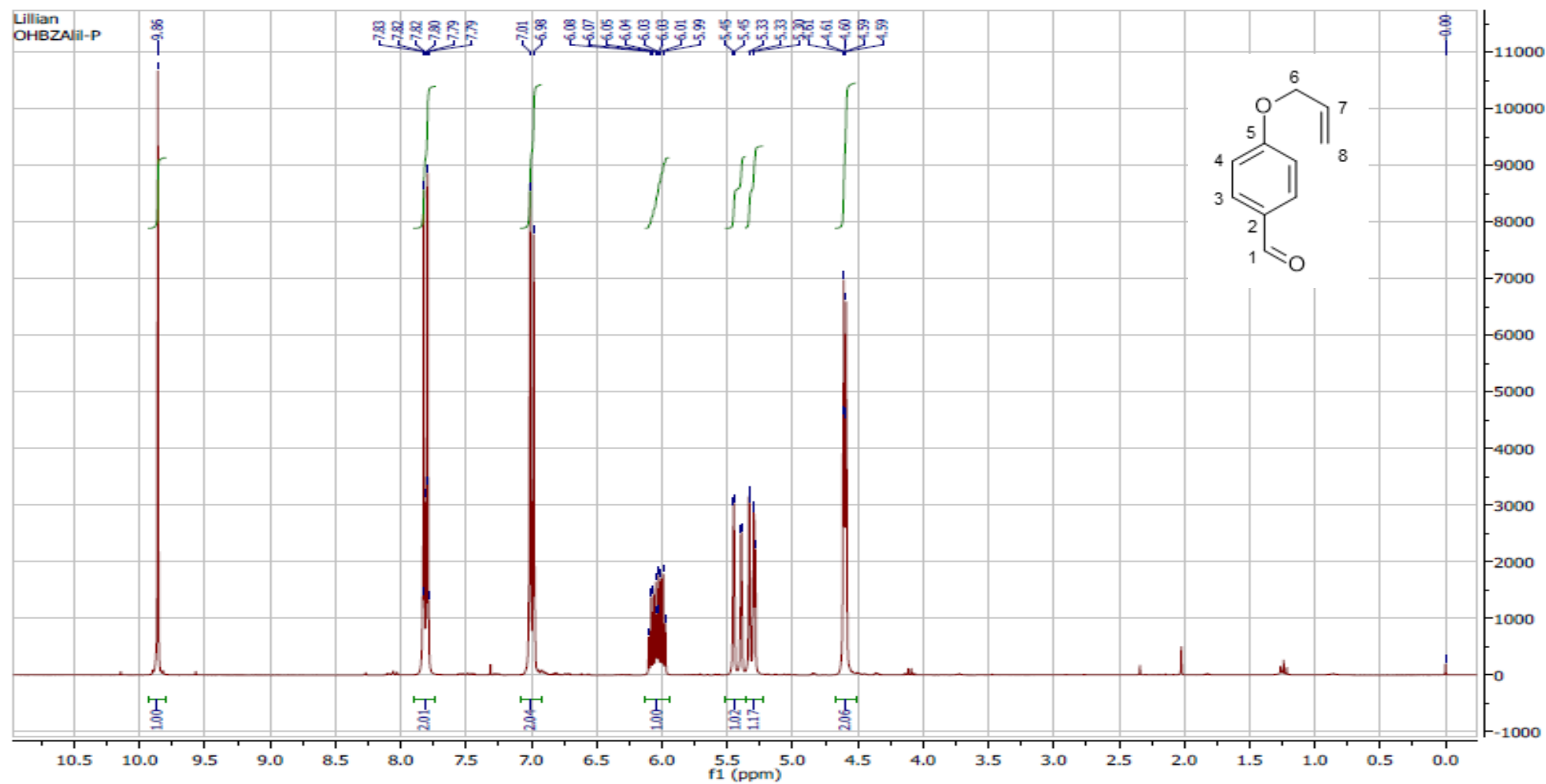
RawMode:Averaged 11.317-11.333(879-881) BasePeak:41(20086)

BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1





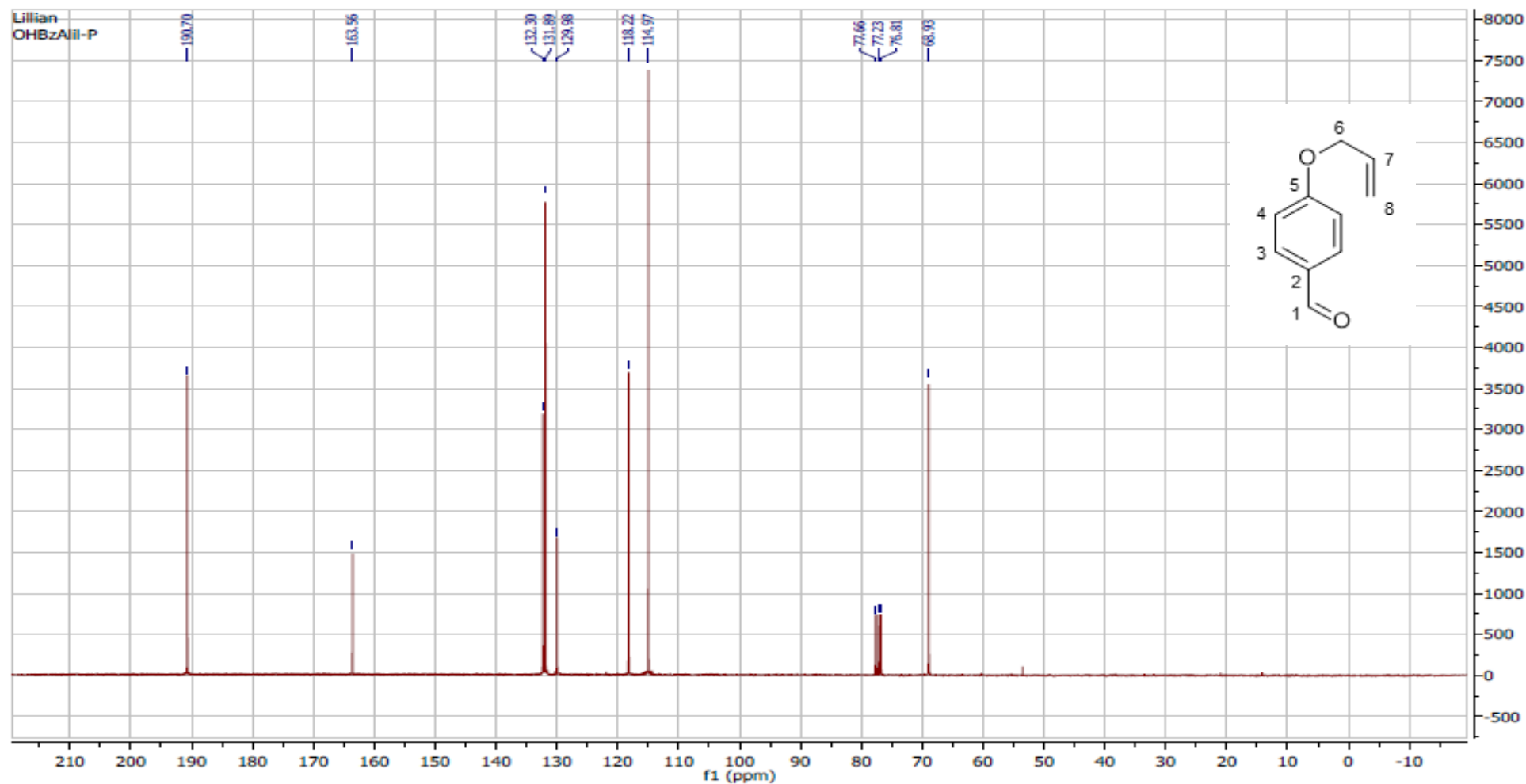
## APÊNDICE 5



**1b:** Óleo levemente amarelado.  $^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz,  $\delta$  = ppm, TMS): 4,60 (dd,  $J$  = 5,1, 1,3 Hz, 2H, H-6), 5,32 (dq,  $J$  = 10,4, 1,3 Hz, 1H, H-8a), 5,45 (dq,  $J$  = 17,2, 1,3 Hz, 1H, H-8b), 5,99-6,08 (m, 1H, H-7), 7,00 (d,  $J$  = 8,6, Hz, 2H, H-4), 7,81 (d,  $J$  = 8,6, Hz, 2H, H-3), 9,86 (s, 1H, H-1).

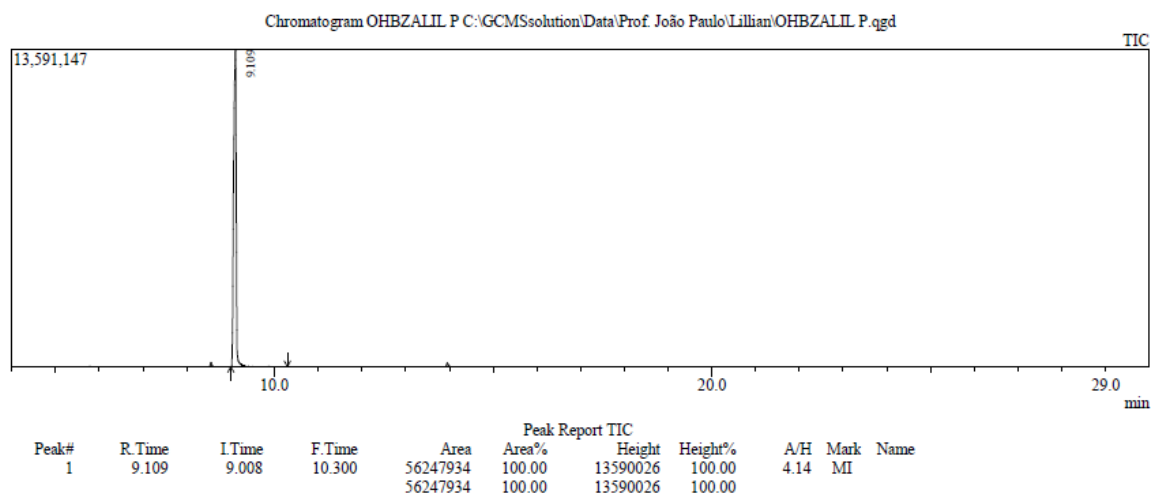
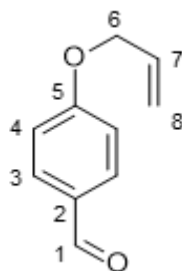


## APÊNDICE 6



**1b**: Óleo levemente amarelado. <sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz, δ = ppm, TMS): 68,9 (C-6), 115,0 (C-4), 118,2 (C-8), 130,0 (C-2), 132,0 (C-3), 132,3 (C-7), 163,6 (C-5), 190,7 (C-1).

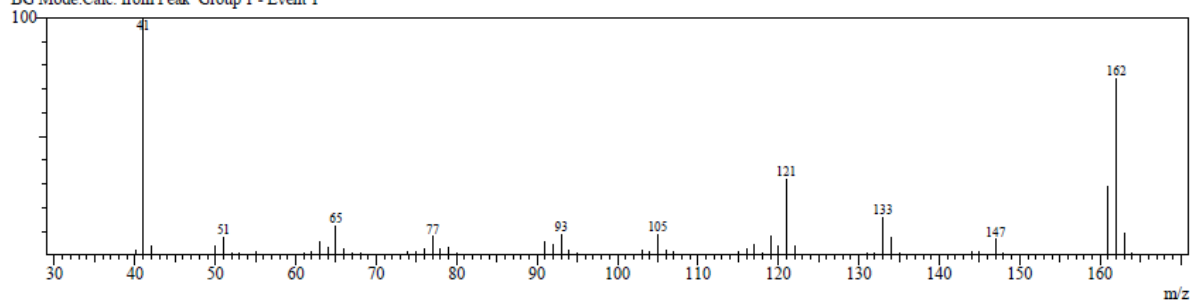
## APÊNDICE 7



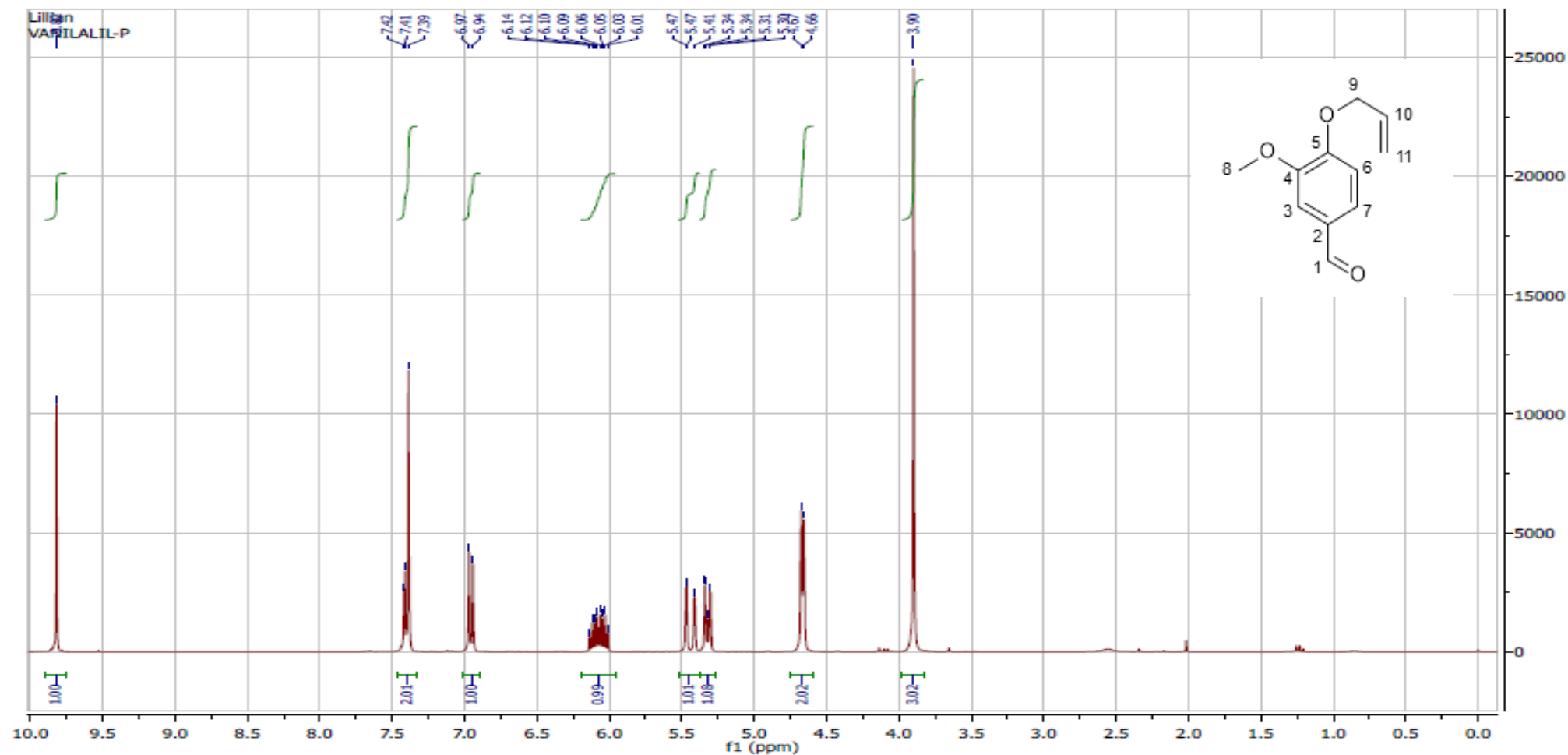
MassPeaks:87

RawMode:Averaged 9.100-9.117(613-615) BasePeak:41(3230230)

BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1

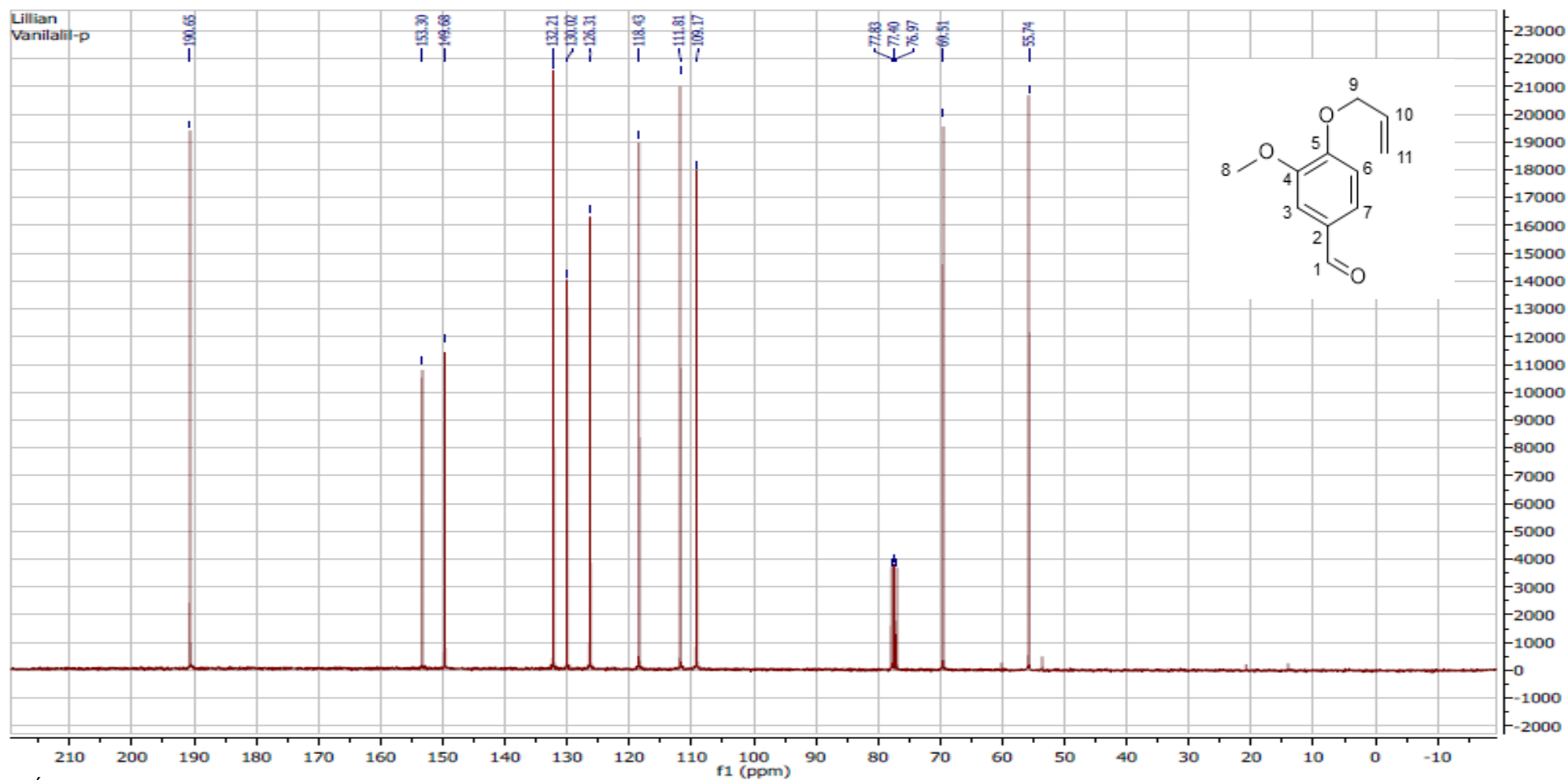


## APÊNDICE 8



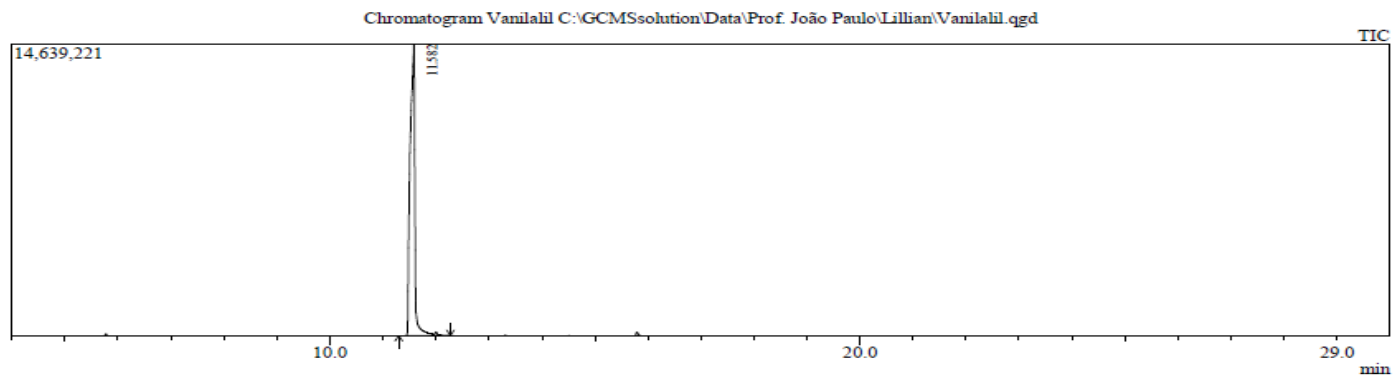
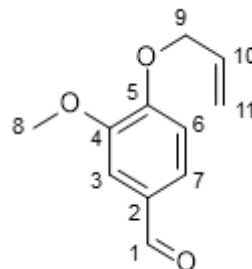
**1c:** Óleo levemente amarelado.  $^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz,  $\delta$  = ppm, TMS): 3,90 (s, 3H, H-8), 4,67 (dt,  $J$  = 5,4, 1,3 Hz, 2H, H-9), 5,32 (dq,  $J$  = 10,4, 1,4 Hz, 1H, H-11a), 5,45 (dq,  $J$  = 17,3, 1,4 Hz, 1H, H-11b), 6,01-6,14 (m, 1H, H-10), 6,96 (dd,  $J$  = 8,6, 2,7 Hz, 1H, H-7), 7,39-7,42 (m, 2H, H-3/6), 9,86 (s, 1H, H-1).

## APÊNDICE 9



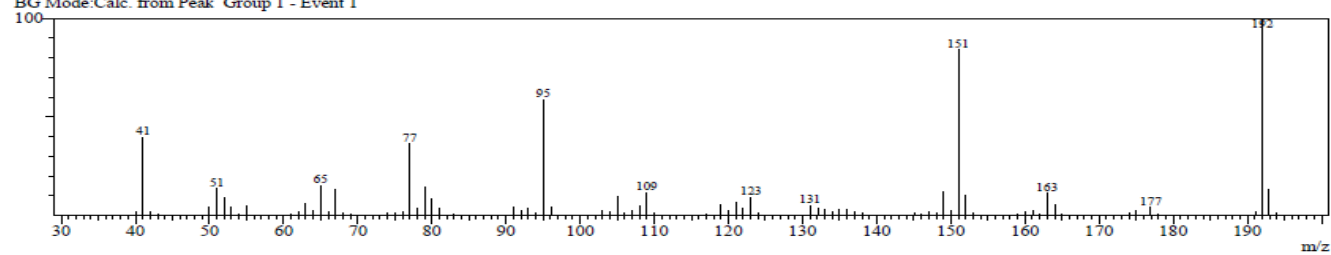
**1c:** Óleo levemente amarelado.  $^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz,  $\delta$  = ppm, TMS): 55,7 (C-8), 69,5 (C-9), 109,2 (C-3), 111,8 (C-6), 118,4 (C-11), 126,3 (C-7), 130,0 (C-2), 132,2 (C-10), 149,7 (C-5), 153,3 (C-4), 190, (C-1).

## APÊNDICE 10

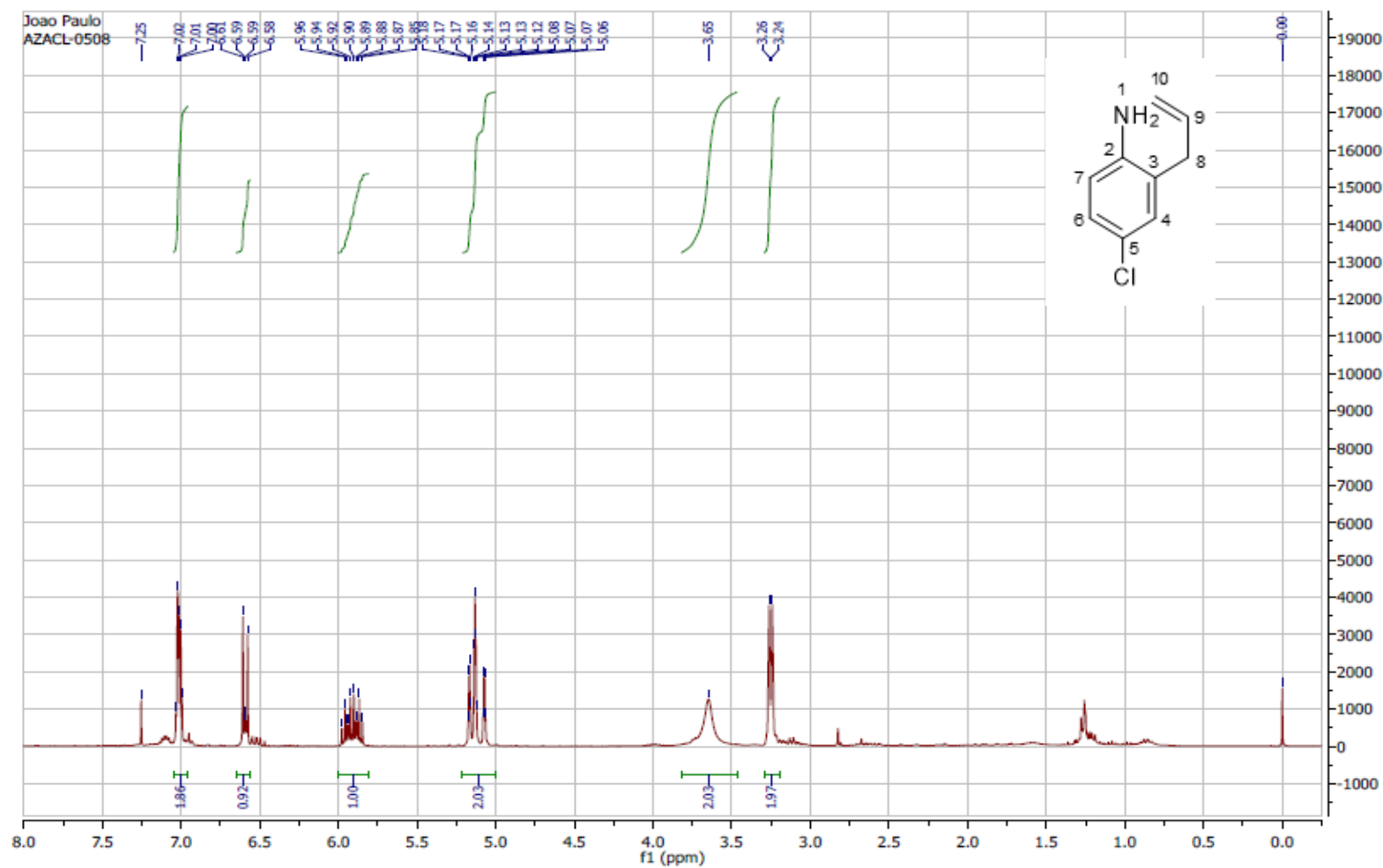


Peak#	R.Time	I.Time	F.Time	Area	Peak Report TIC		Height	Height%	A/H	Mark	Name
					Area%	Height					
1	11.582	11.300	12.275	91958712	100.00	14631291	100.00	100.00	6.29	MI	
				91958712	100.00	14631291	100.00	100.00			

Line#:1 R.Time:11.583(Scan#:911)  
 MassPeaks:121  
 RawMode:Averaged 11.575-11.592(910-912) BasePeak:192(2297912)  
 BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1

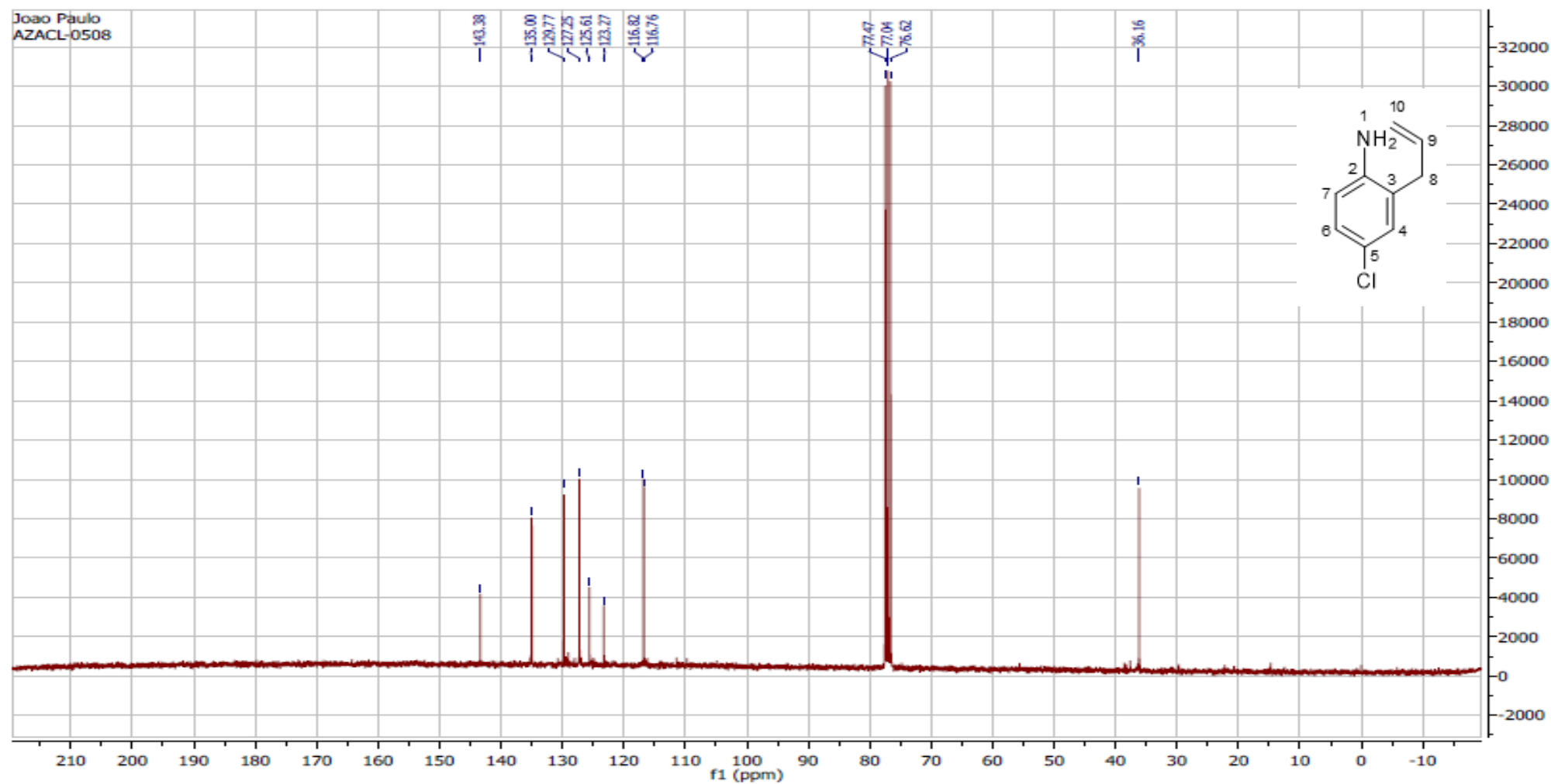


## APÊNDICE 11



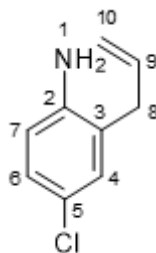
**2a:** Óleo roxo. <sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz, δ = ppm, TMS): 3,25 (d, *J* = 6,1 Hz, 2H, H-8), 3,65 (sl, 2H, H-1), 5,06-5,18 (m, 2H, H-10), 5,91 (ddt, *J* = 16,3, 10,2, 6,1 Hz, 1H, H-9), 6,58-6,61 (m, 1H, H-7), 7,00-7,02 (m, 2H, H-6/4).

## APÊNDICE 12

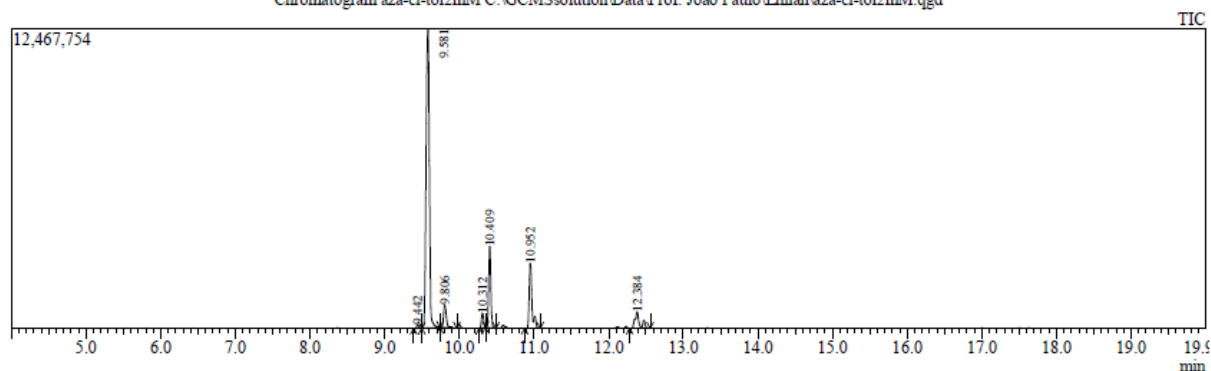


**2a:** Óleo roxo. <sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz, δ = ppm, TMS): 36,2 (C-8), 116,7 (C-10), 116,8 (C-7), 123,3 (C-3), 125,6 (C-5), 127,3 (C-6), 129,8 (C-4), 135,0 (C-9), 143,4 (C-2).

## APÊNDICE 13



Chromatogram aza-cl-tol2mM C:\GCMSsolution\Data\Prof. João Paulo\Lillian\aza-cl-tol2mM.qgd



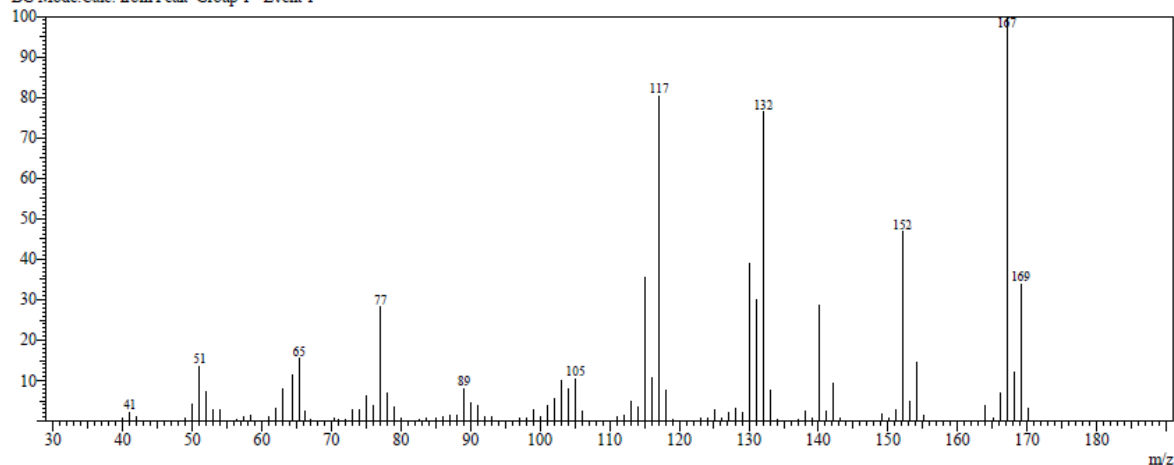
Peak#	R.Time	I.Time	F.Time	Area	Area%	Height	Height%	A/H	Mark	Name
1	9.442	9.392	9.500	277045	0.47	145372	0.70	1.91	MI	
2	9.581	9.500	9.742	38128233	65.07	12452005	59.53	3.06	MI	
3	9.806	9.742	9.967	2242694	3.83	937516	4.48	2.39	MI	
4	10.312	10.267	10.350	1270791	2.17	595215	2.85	2.14	MI	
5	10.409	10.350	10.492	6796888	11.60	3374390	16.13	2.01	MI	
6	10.952	10.875	11.083	6794311	11.59	2720956	13.01	2.50	MI	
7	12.384	12.283	12.558	3089307	5.27	690921	3.30	4.47	MI	
				58599269	100.00	20916375	100.00			

Line# 2 R.Time: 9.583 (Scan#: 671)

MassPeaks: 112

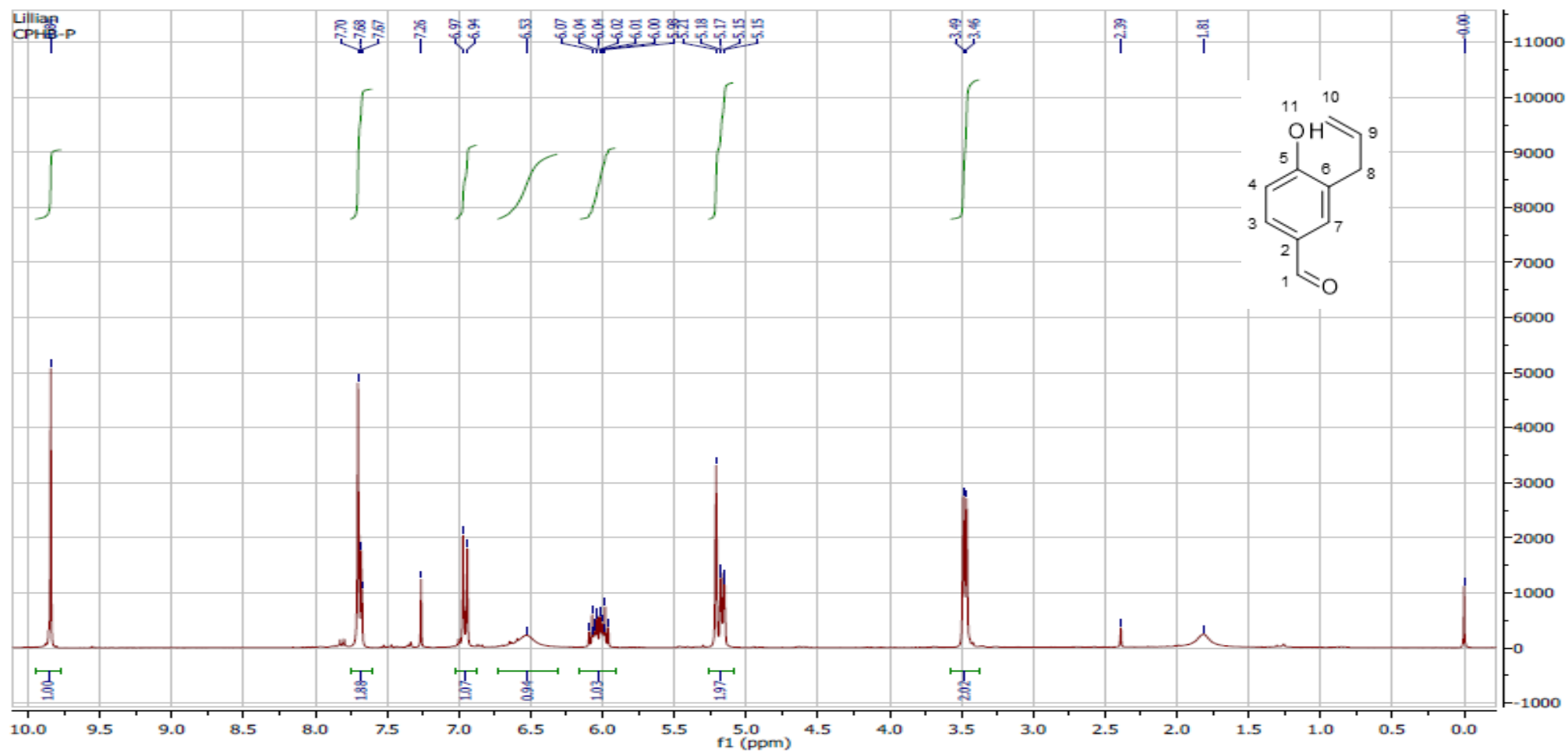
RawMode: Averaged 9.575-9.592 (670-672) BasePeak: 167 (1484014)

BG Mode: Calc. from Peak Group 1 - Event 1



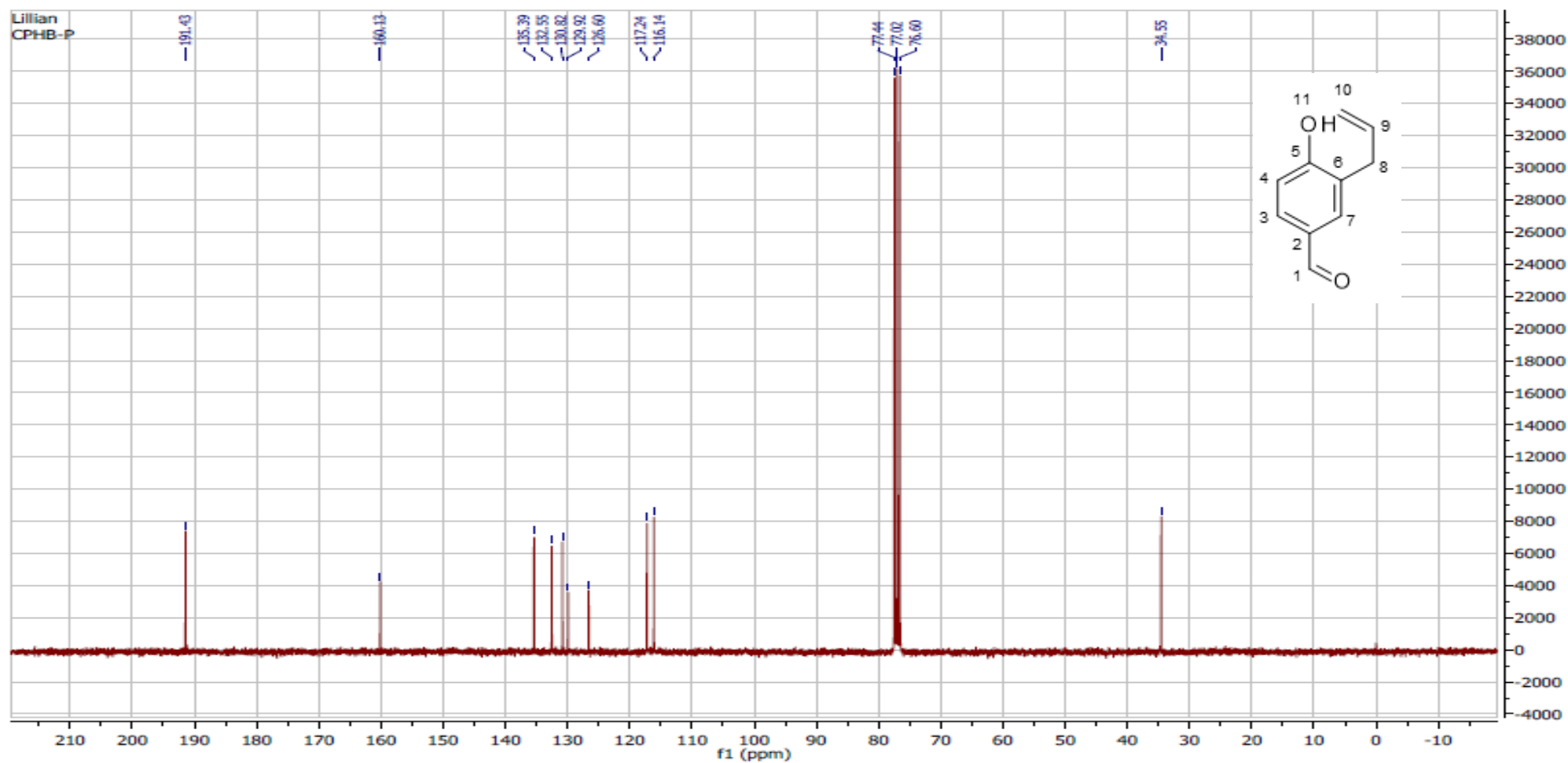


## APÊNDICE 14



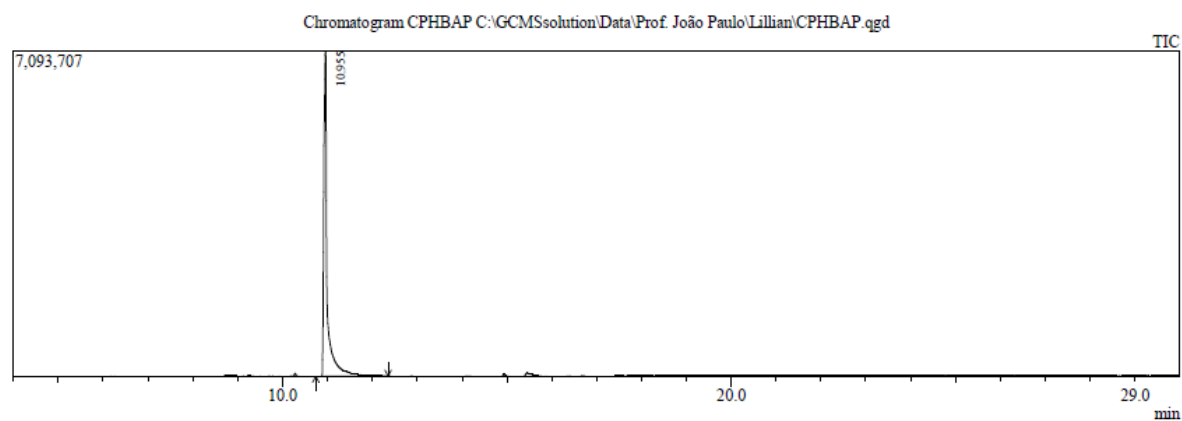
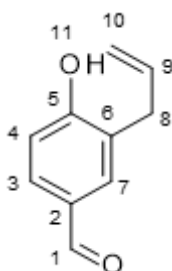
**2b**: Sólido branco.  $^1\text{H}$ -RMN (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz,  $\delta$  = ppm, TMS): 3,48 (d,  $J$  = 6,4 Hz, 2H, H-8), 5,15-5,21 (m, 2H, H-10), 5,98-6,07 (m, 1H, H-9), 6,94-6,97 (m, 1H, H-4), 7,67-7,70 (m, 2H, H-3/7), 9,84 (s, 1H, H-1).

## APÊNDICE 15



**2b**: Sólido branco.  $^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz,  $\delta$  = ppm, TMS): 34,6 (C-8), 116,1 (C-4), 117,2 (C-10), 126,6 (C-6), 129,9 (C-2), 131,7 (C-3), 135,4 (C-7), 160,1 (C-5), 191,4 (C-1).

## APÊNDICE 16



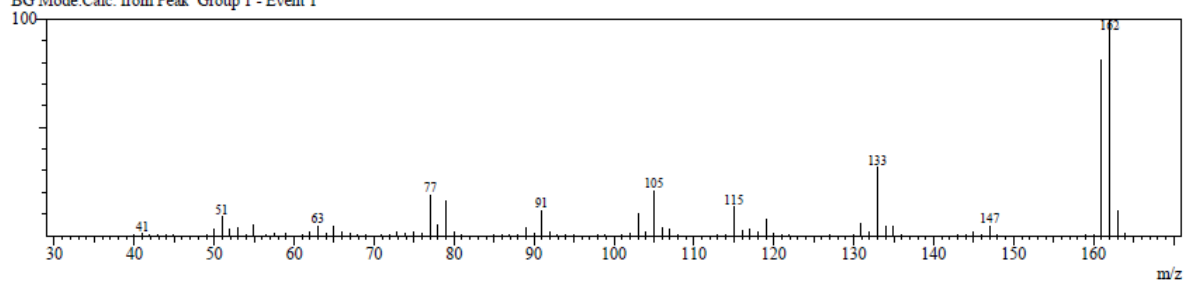
Peak Report TIC									
Peak#	R.Time	I.Time	F.Time	Area	Area%	Height	Height%	A/H	Mark
1	10.955	10.742	12.350	37781361	100.00	7091617	100.00	5.33	MI
				37781361	100.00	7091617	100.00		

Line#:1 R.Time:10.958(Scan#:836)

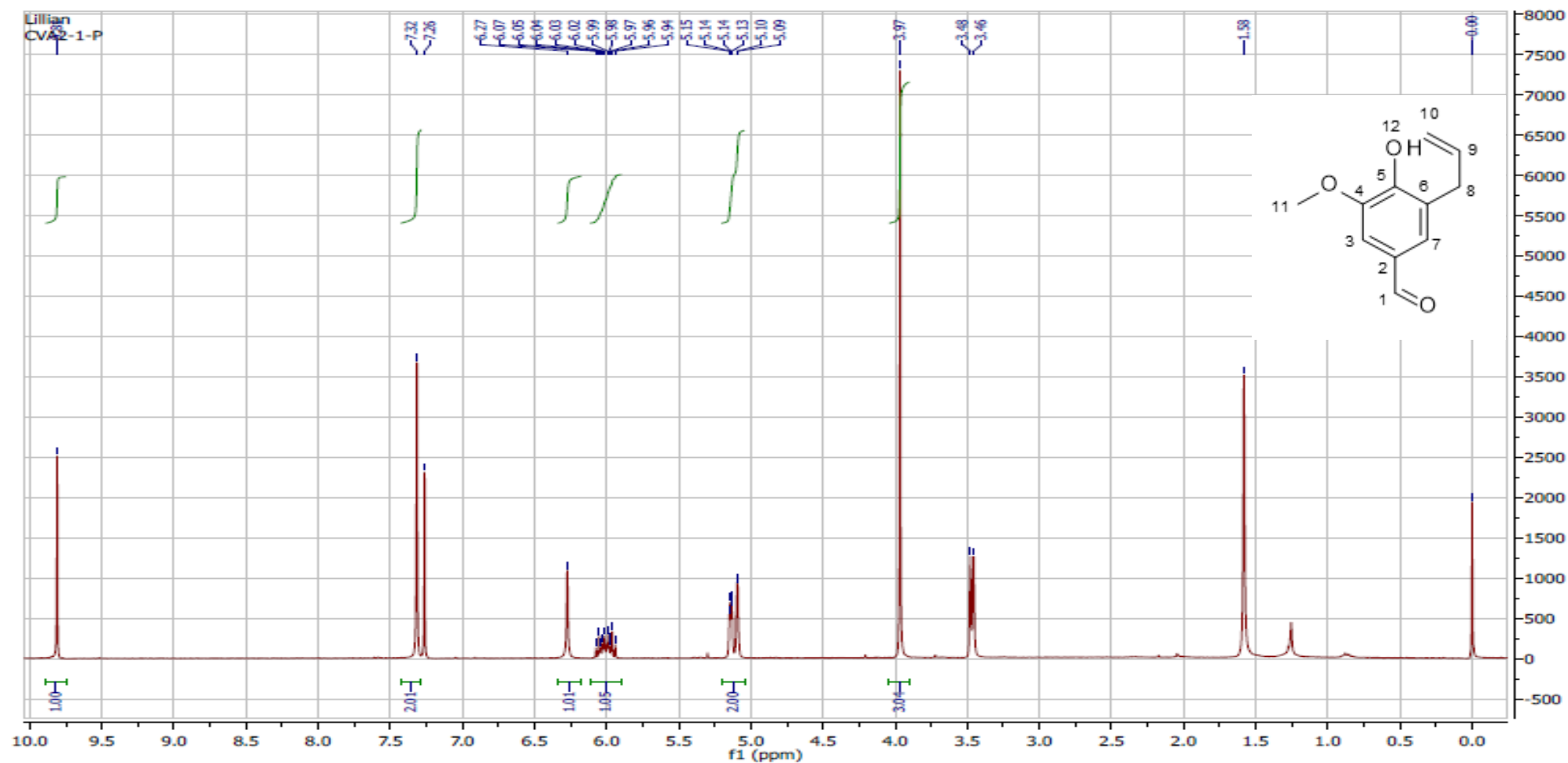
MassPeaks:88

RawMode:Averaged 10.950-10.967(835-837) BasePeak:162(1544464)

BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1

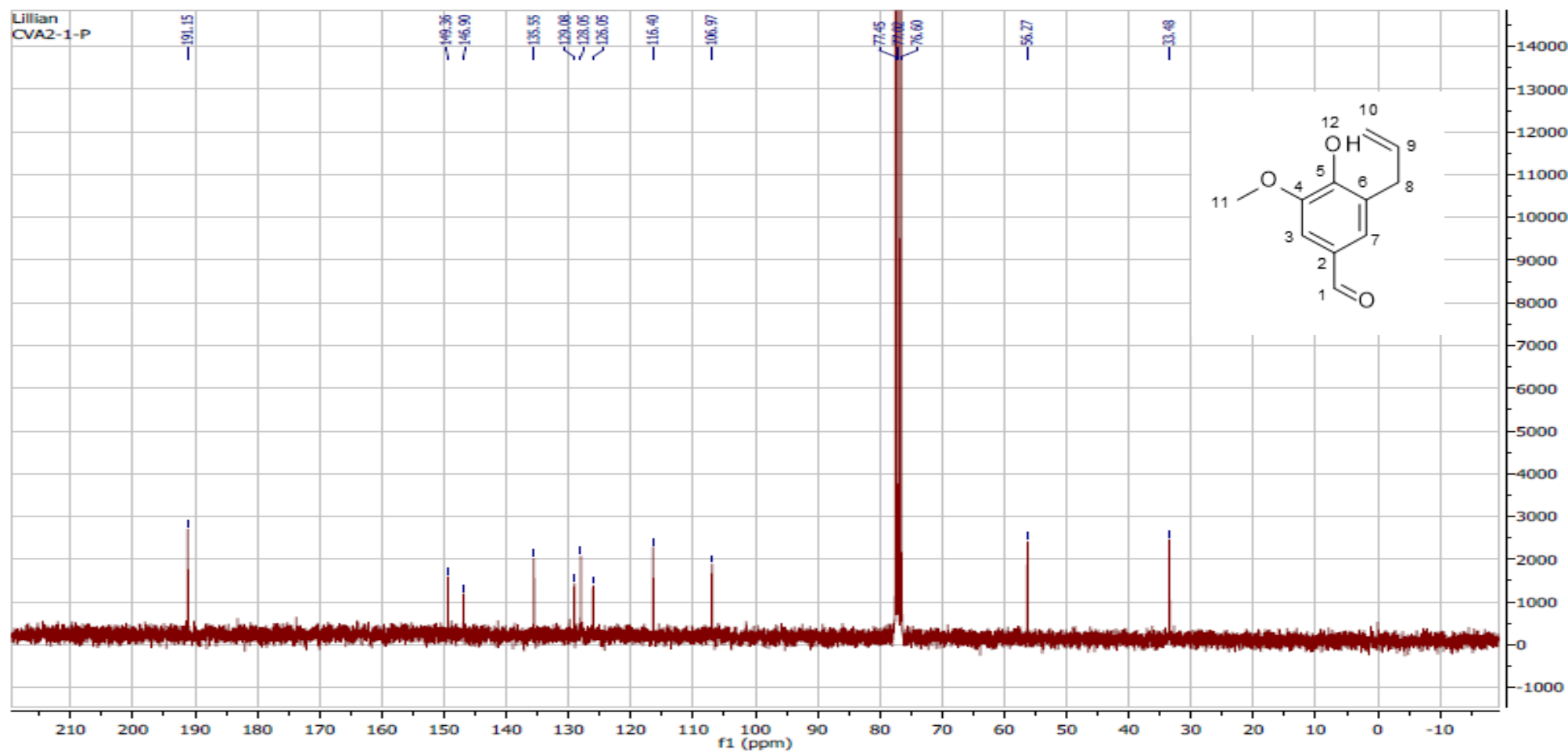


## APÊNDICE 17



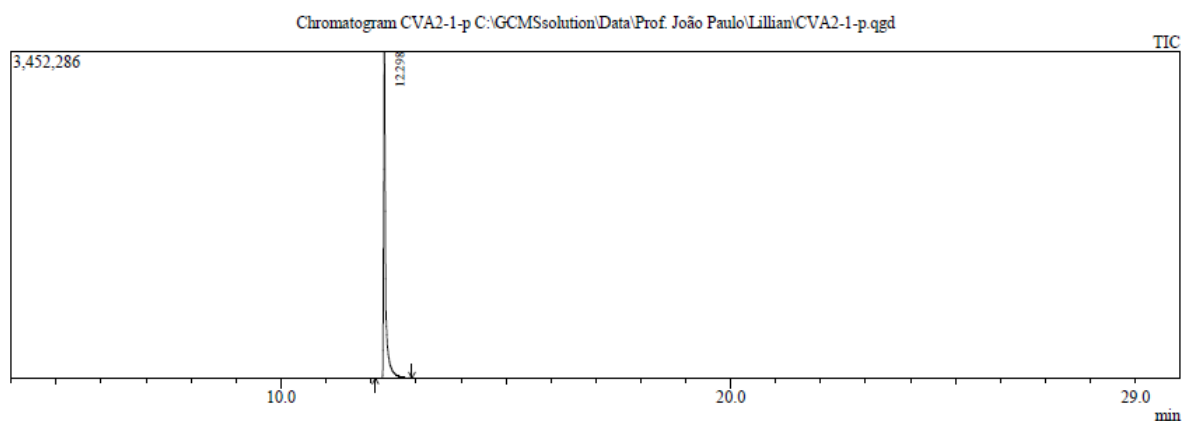
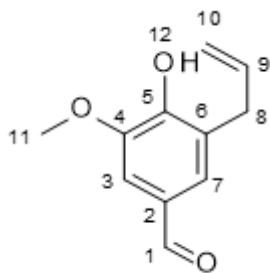
**2c**: Sólido levemente amarelado.  $^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz,  $\delta$  = ppm, TMS): 3,47 (dt,  $J$  = 6,6, 1,3 Hz, 2H, H-8), 3,97 (s, 3H, H-11), 5,09-5,15 (m, 2H, H-10), 5,94-6,07 (m, 1H, H-9), 6,27 (sl, 1H, H-12), 7,29 (m, 2H, H-3/7), 9,81 (s, 1H, H-1).

## APÊNDICE 18



**2c:** Sólido levemente amarelado.  $^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz,  $\delta$  = ppm, TMS): 33,5 (C-8), 56,3 (C-11), 107,0 (C-3), 116,4 (C-10), 126,1 (C-2), 128,1 (C-6), 129,1 (C-7), 135,6 (C-9), 146,9 (C-5), 149,4 (C-4), 191,2 (C-1).

## APÊNDICE 19



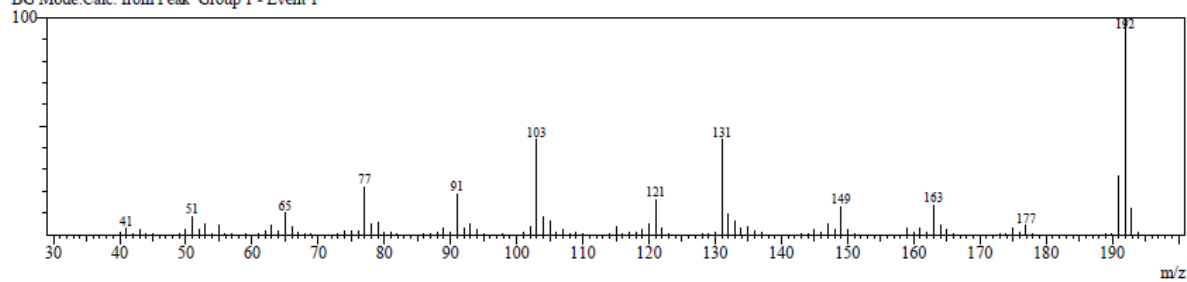
Peak Report TIC									
Peak#	R.Time	I.Time	F.Time	Area	Area%	Height	Height%	A/H	Mark
1	12.298	12.100	12.908	10660598	100.00	3451606	100.00	3.09	MI
				10660598	100.00	3451606	100.00		

Line#:1 R.Time:12.300(Scan#:997)

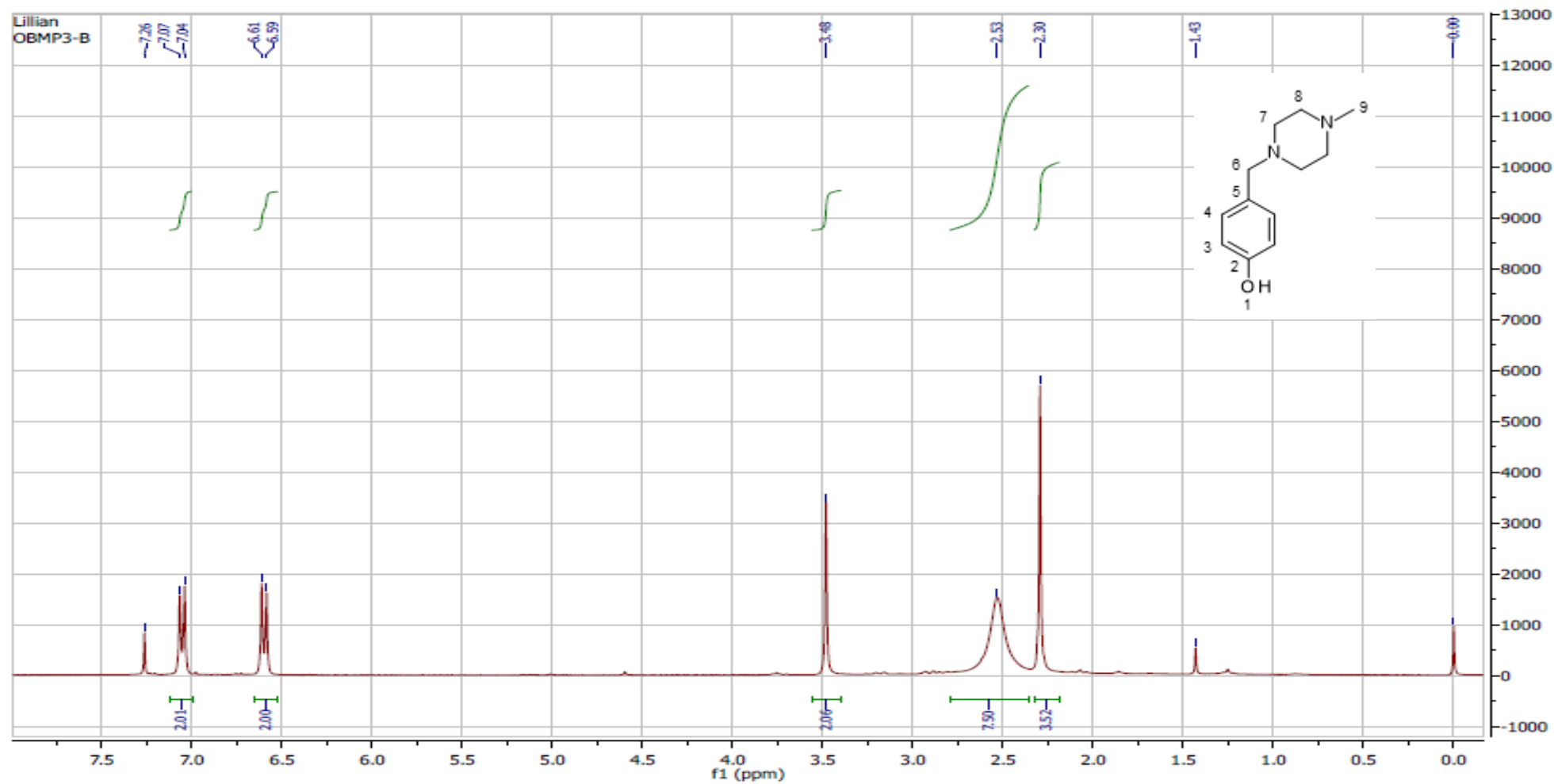
MassPeaks:109

RawMode:Averaged 12.292-12.308(996-998) BasePeak:192(622170)

BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1

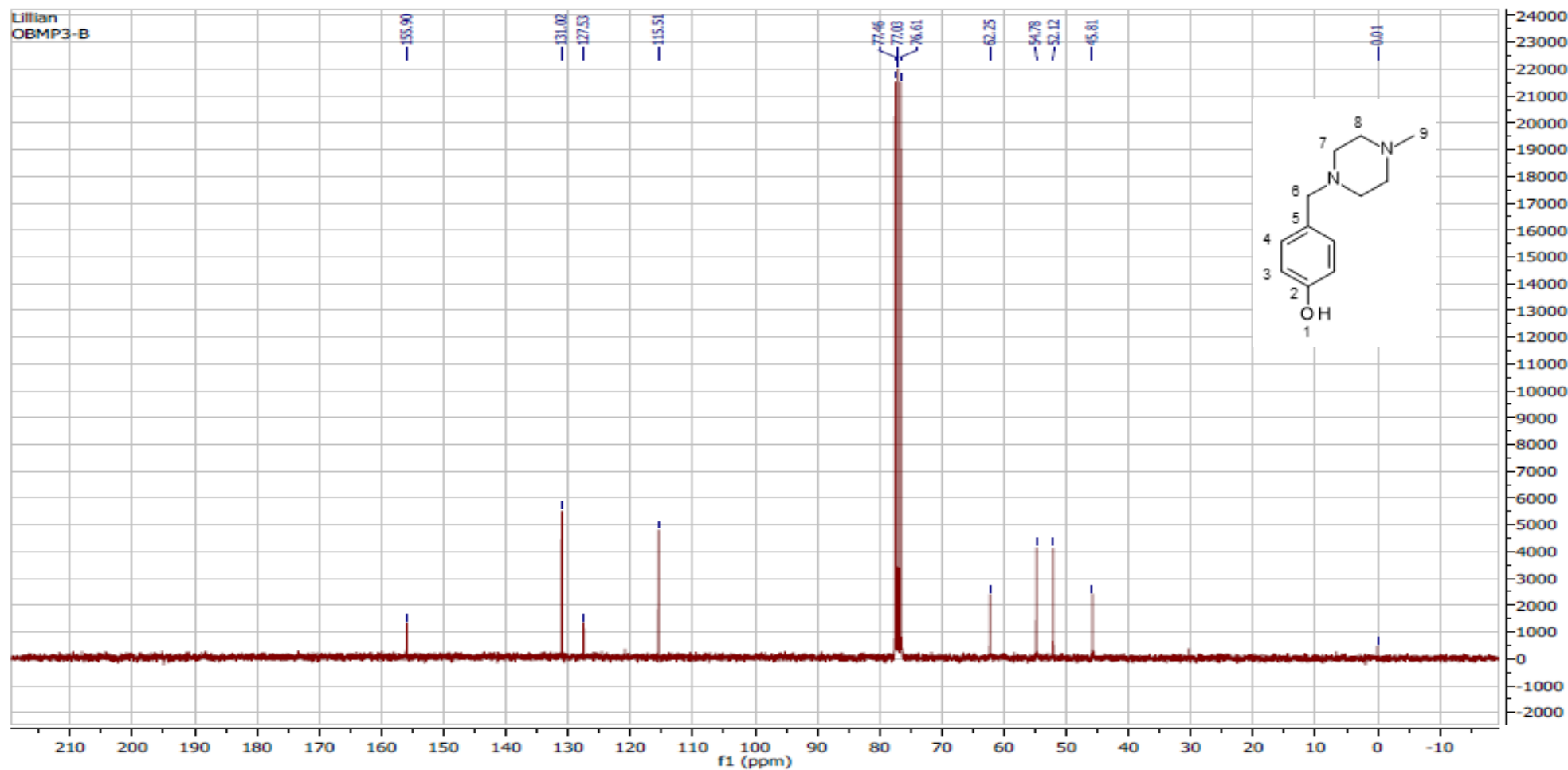


## APÊNDICE 20



**3b**: Sólido branco.  $^1\text{H}$ -RMN (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz,  $\delta$  = ppm, TMS): 2,30 (s, 3H, H-9), 2,53 (sl, 8H, H-7/8), 3,48 (s, 2H, H-6), 6,60 (d,  $J$  = 8,3 Hz, 2H, H-4), 7,06 (d,  $J$  = 8,3 Hz, 2H, H-3).

## APÊNDICE 21

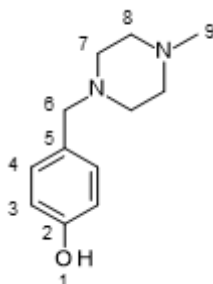


**3b:** Sólido branco.  $^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz,  $\delta$  = ppm, TMS): 45,8 (C-9), 52,1 (C-7), 54,8 (C-8), 62,3 (C-6), 115,5 (C-4), 127,5 (C-5), 131,0 (C-3), 155,9 (C-2).

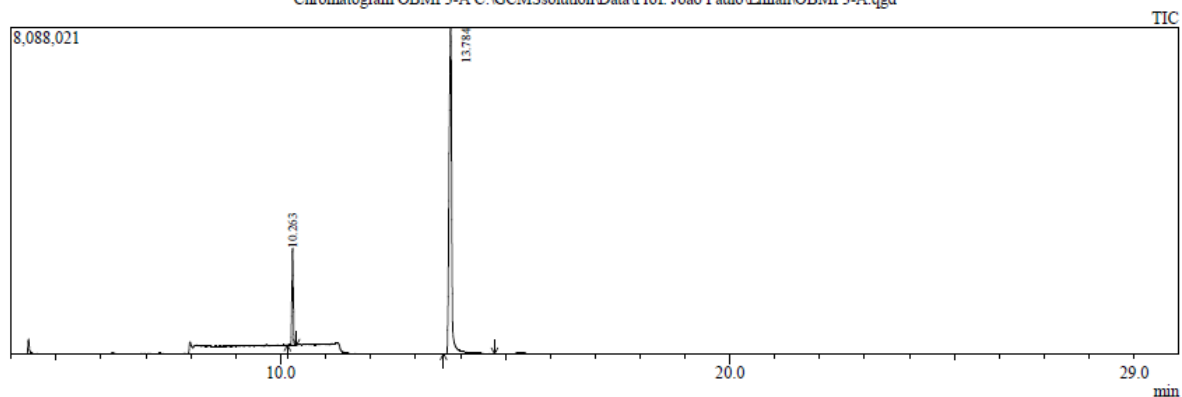
EMBR:  $m/z$  (int. rel.) = 206  $[\text{M}]^+$  (68), 148 (48), 135 (72), 107 (100), 99 (64), 70 (28), 56 (62).



## APÊNDICE 22



Chromatogram OBMP3-A C:\GCMSsolution\Data\Prof. João Paulo\Lillian\OBMP3-A.qgd



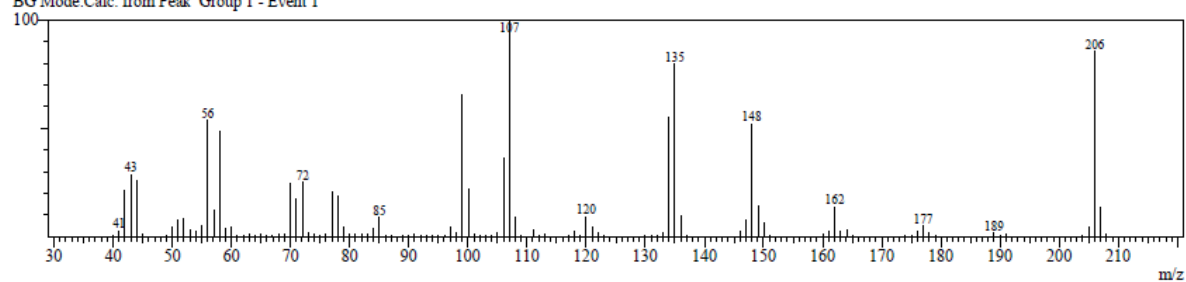
Peak#	R.Time	I.Time	F.Time	Area	Area%	Height	Height%	A/H	Mark	Name
1	10.263	10.150	10.350	5071158	13.00	2403647	22.91	2.11	MI	
2	13.784	13.625	14.758	33928880	87.00	8086841	77.09	4.20	MI	
				39000038	100.00	10490488	100.00			

Line#:2 R.Time:13.783(Scan#:1175)

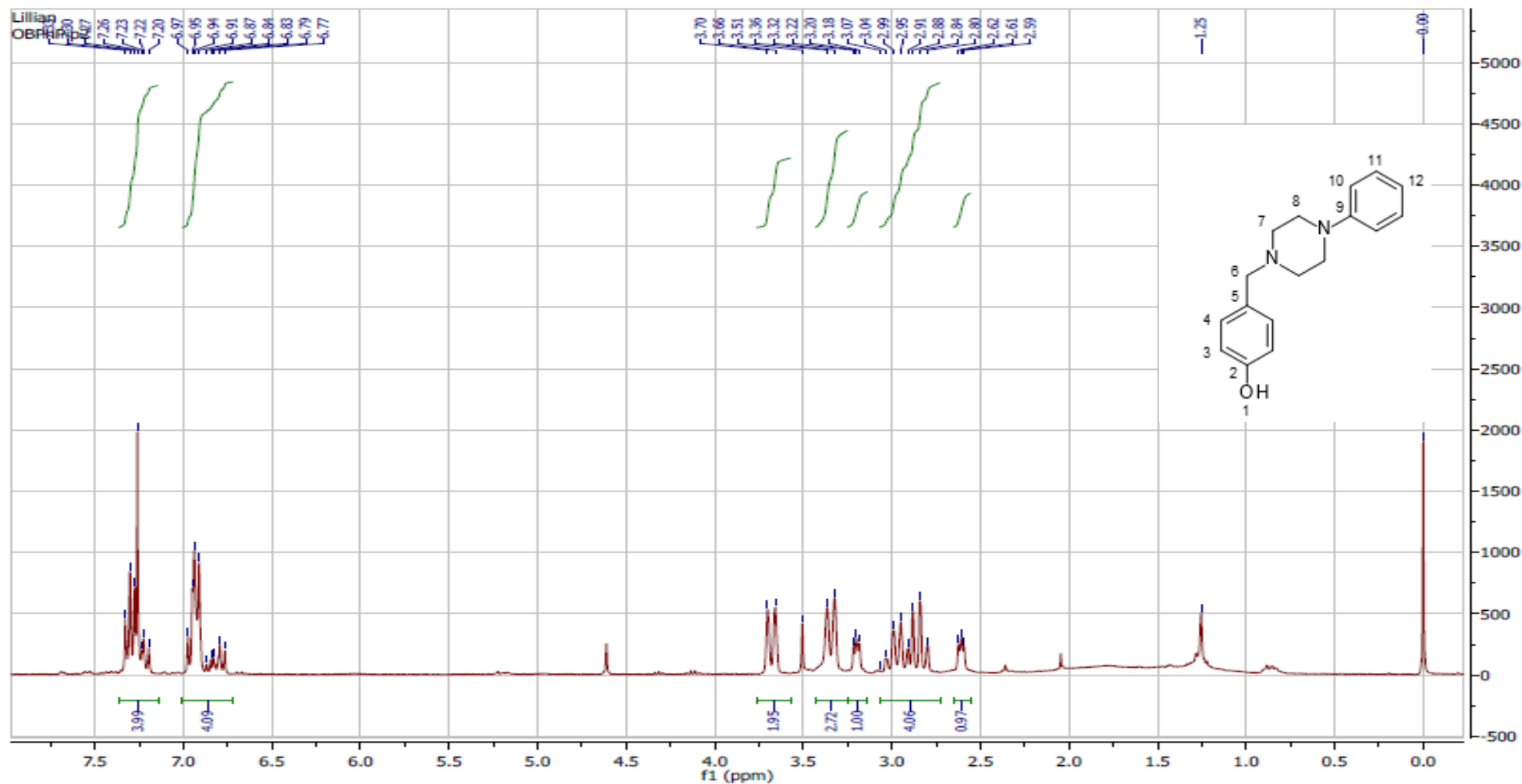
MassPeaks:115

RawMode:Averaged 13.775-13.792(1174-1176) BasePeak:107(764957)

BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1

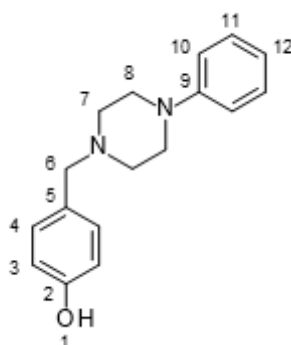


## APÊNDICE 23

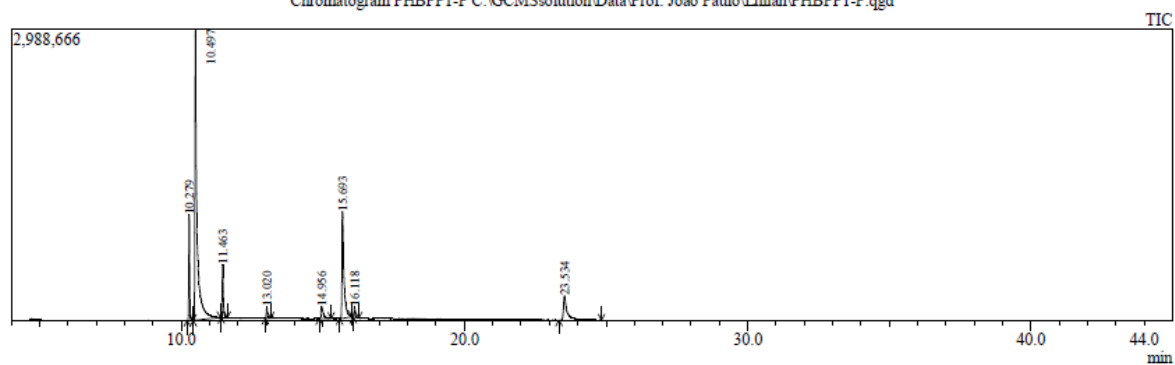


**4b:** Sólido branco. <sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz, δ = ppm, TMS): 2,61 (t, *J* = 4,8 Hz, 1H, H-6a), 2,80-3,07 (m, 4H, H-7), 3,18 (t, *J* = 4,8 Hz, 1H, H-6b), 3,40 (d, *J* = 12,5 Hz, 2H, H-8a), 3,68 (d, *J* = 12,5 Hz, 2H, H-8b), 6,77-6,91 (m, 1H, H-12), 6,95 (dd, *J* = 10,7, 8,1 Hz, 4H, H-3/10), 7,20-7,33 (m, 4H, H-4/11).

## APÊNDICE 24



Chromatogram PHBPP1-P C:\GCMs\solution\Data\Prof. João Paulo\Lilian\PHBPP1-P.qgd



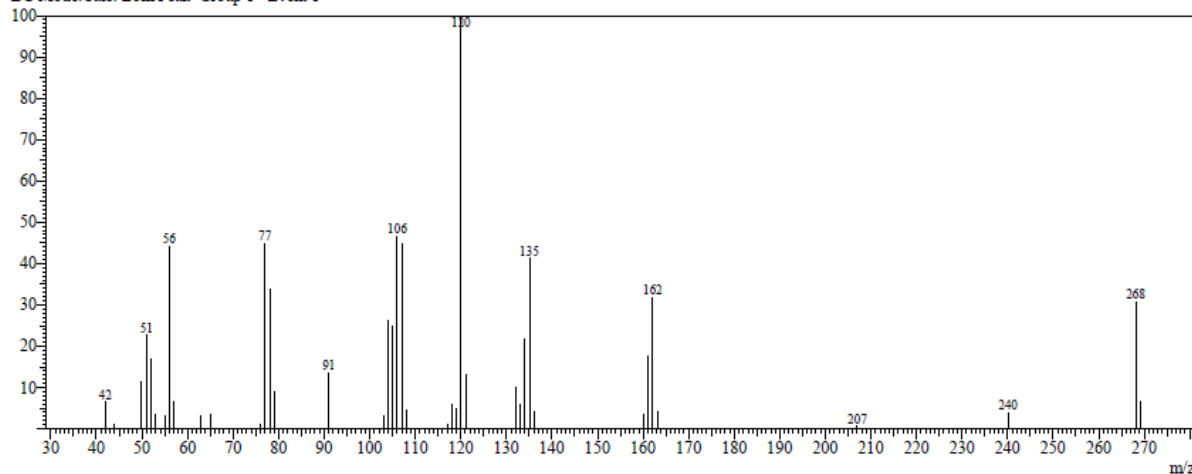
Peak#	R.Time	I.Time	F.Time	Area	Area%	Height	Height%	A/H	Mark	Name
1	10.279	10.208	10.417	2261603	8.30	1079921	17.12	2.09	MI	
2	10.497	10.425	11.375	14908463	54.73	2982264	47.27	5.00	MI	
3	11.463	11.408	11.625	1433962	5.26	544468	8.63	2.63	MI	
4	13.020	12.967	13.158	321623	1.18	120837	1.92	2.66	MI	
5	14.956	14.867	15.292	708873	2.60	125575	1.99	5.65	MI	
6	15.693	15.592	16.025	5155378	18.93	1094733	17.35	4.71	MI	
7	16.118	16.075	16.267	289456	1.06	115717	1.83	2.50	MI	
8	23.534	23.342	24.842	2158310	7.92	245773	3.90	8.78	MI	
				27237668	100.00	6309288	100.00			

Line# 8 R.Time: 23.533 (Scan#: 2345)

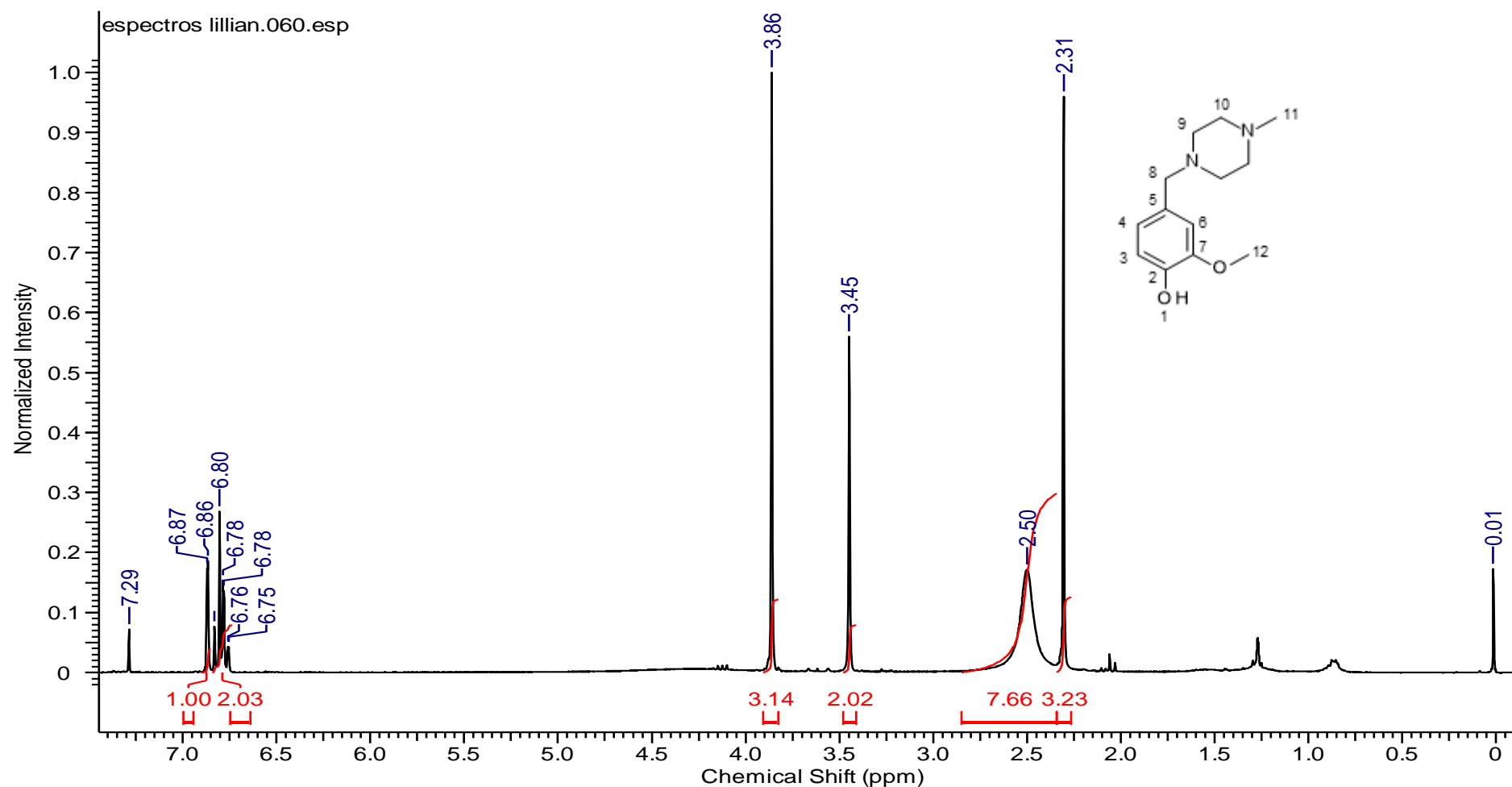
MassPeaks: 40

RawMode: Averaged 23.525-23.542 (2344-2346) BasePeak: 120 (35509)

BG Mode: Calc. from Peak Group 1 - Event 1

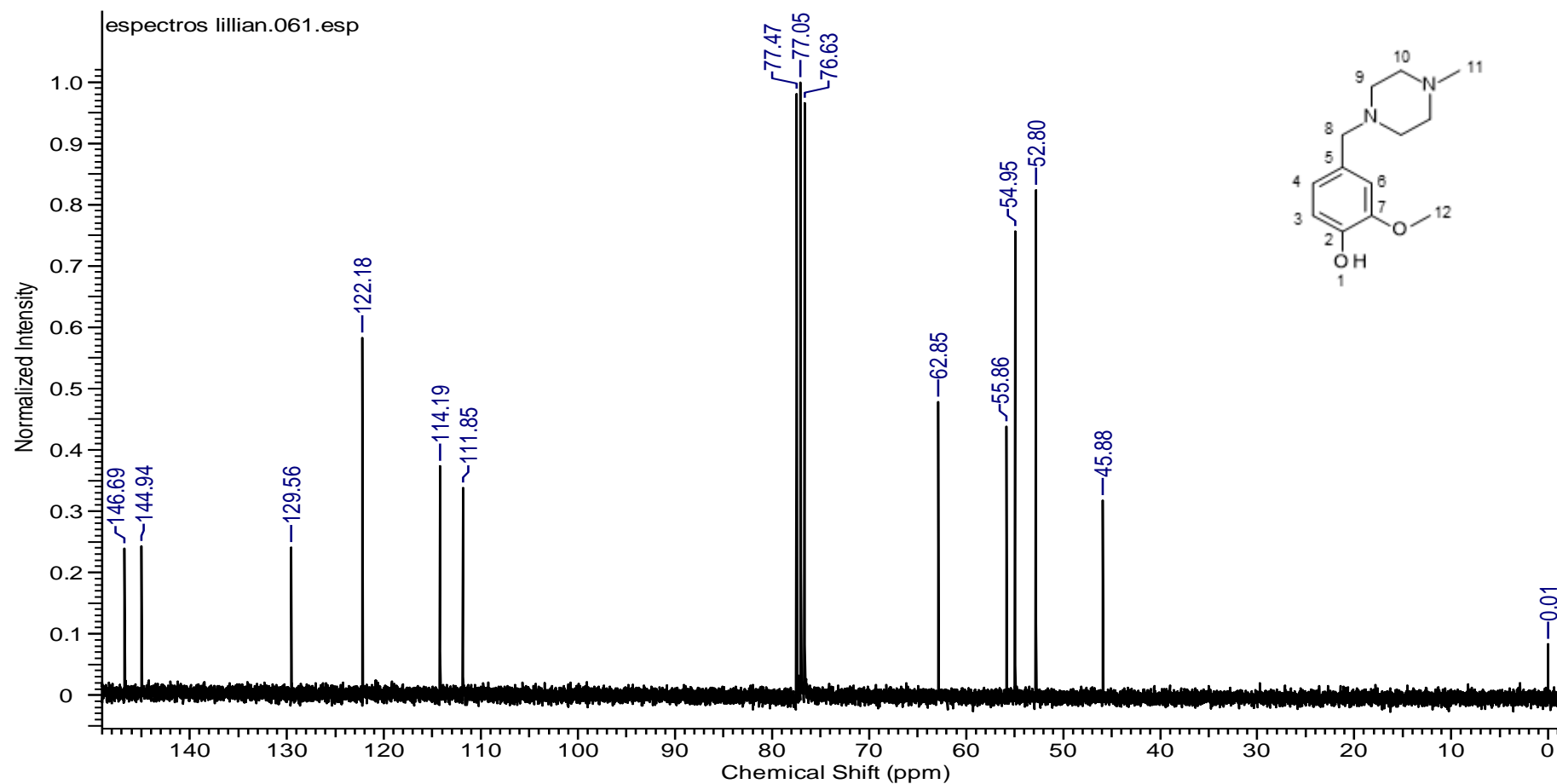


## APÊNDICE 25



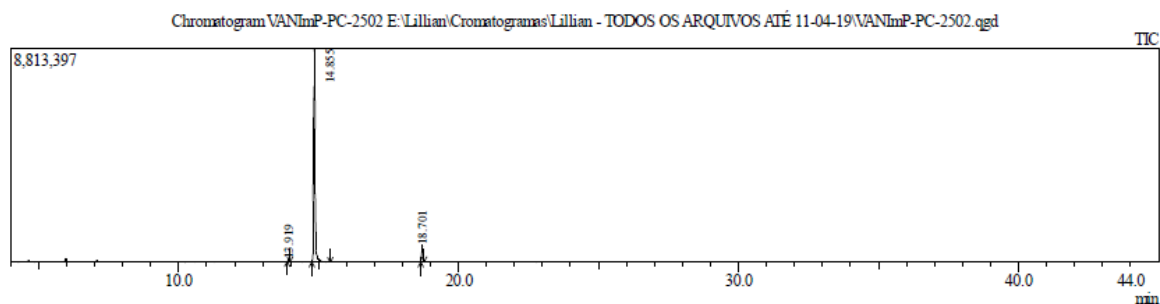
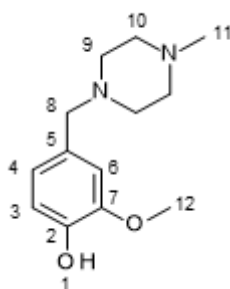
**3c**: Sólido branco.  $^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz,  $\delta$  = ppm, TMS): 2,31 (s, 3H, H-11), 2,50 (sl, 8H, H-9/10), 3,45 (s, 2H, H-8), 3,86 (s, 3H, H-12), 6,75-6,87 (m, 3H, H-3/4/6).

## APÊNDICE 26



**3c:** Sólido branco. <sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz, δ = ppm, TMS): 45,9 (C-11), 52,8 (C-9), 55,0 (C-10), 55,9 (C-12), 62,9 (C-8), 111,9 (C-6), 114,2 (C-3), 122,2 (C-4), 129,6 (C-5), 145,0 (C-7), 146,7 (C-2).

## APÊNDICE 27



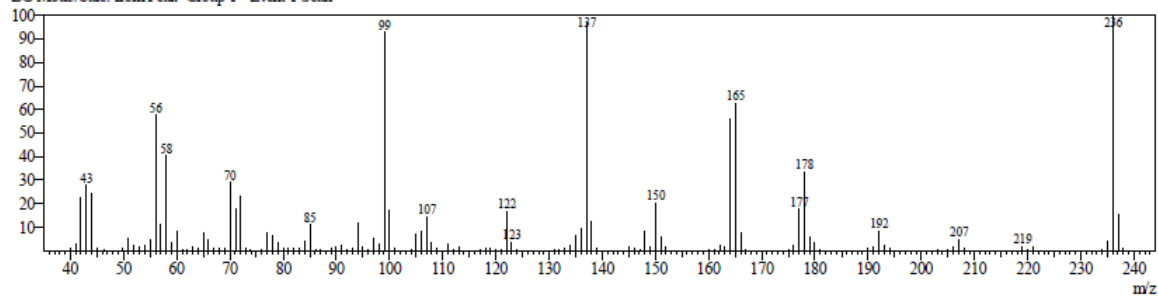
Peak Report TIC									
Peak#	R. Time	I. Time	F. Time	Area	Area%	Height	Height%	A/H	Mark
1	13.919	13.892	13.975	208691	0.56	100788	1.05	2.07	MI
2	14.855	14.758	15.417	35044950	94.52	8802498	91.89	3.98	MI
3	18.701	18.658	18.767	1824422	4.92	676411	7.06	2.70	MI
				37078063	100.00	9579697	100.00		

Line#:2 R. Time:14.858(Scan#:1304)

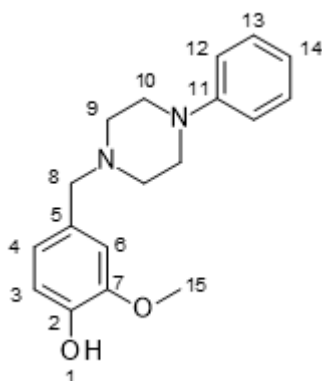
MassPeaks:139

RawMode: Averaged 14.850-14.867(1303-1305) BasePeak:236(781816)

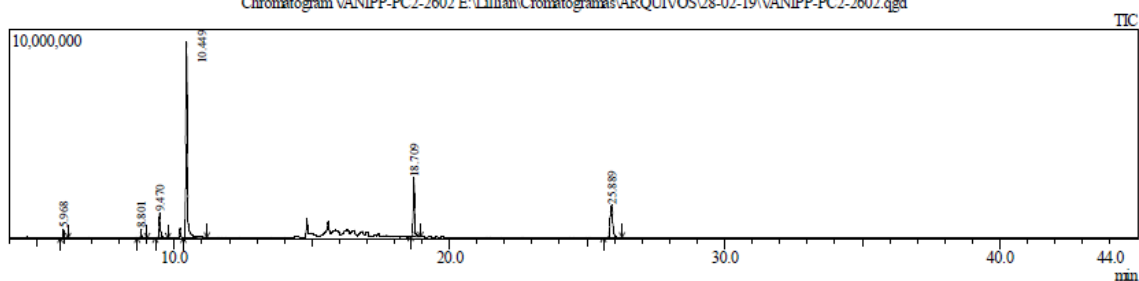
BG Mode: Calc. from Peak Group 1 - Event 1 Scan



## APÊNDICE 28



Chromatogram VANIPP-PC2-2602 E:\Lilian\Cromatogramas\ARQUIVOS\28-02-19\VANIPP-PC2-2602.qgd



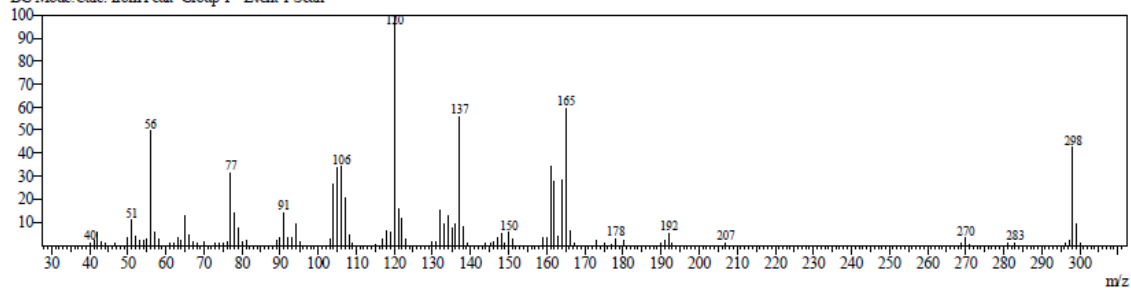
Peak Report TIC										
Peak#	R. Time	I. Time	F. Time	Area	Area%	Height	Height%	A/H	Mark	Name
1	5.968	5.867	6.150	861600	1.40	417642	2.64	2.06	MI	
2	8.801	8.650	9.008	1081896	1.76	421236	2.66	2.57	MI	
3	9.470	9.325	9.767	3725997	6.05	1194073	7.55	3.12	MI	
4	10.449	10.325	11.200	36146852	58.70	9404047	59.45	3.84	MI	
5	18.709	18.592	18.950	9441378	15.33	2822100	17.84	3.35	MI	
6	25.889	25.592	26.267	10316069	16.75	1560061	9.86	6.61	MI	
				61573792	100.00	15819159	100.00			

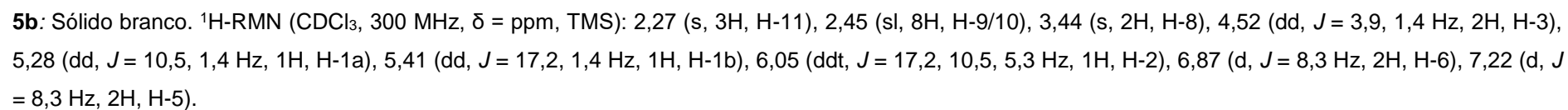
Line# 6 R. Time: 25.892 (Scan#: 2628)

MassPeaks: 102

RawMode: Averaged 25.883-25.900 (2627-2629) BasePeak: 120 (175831)

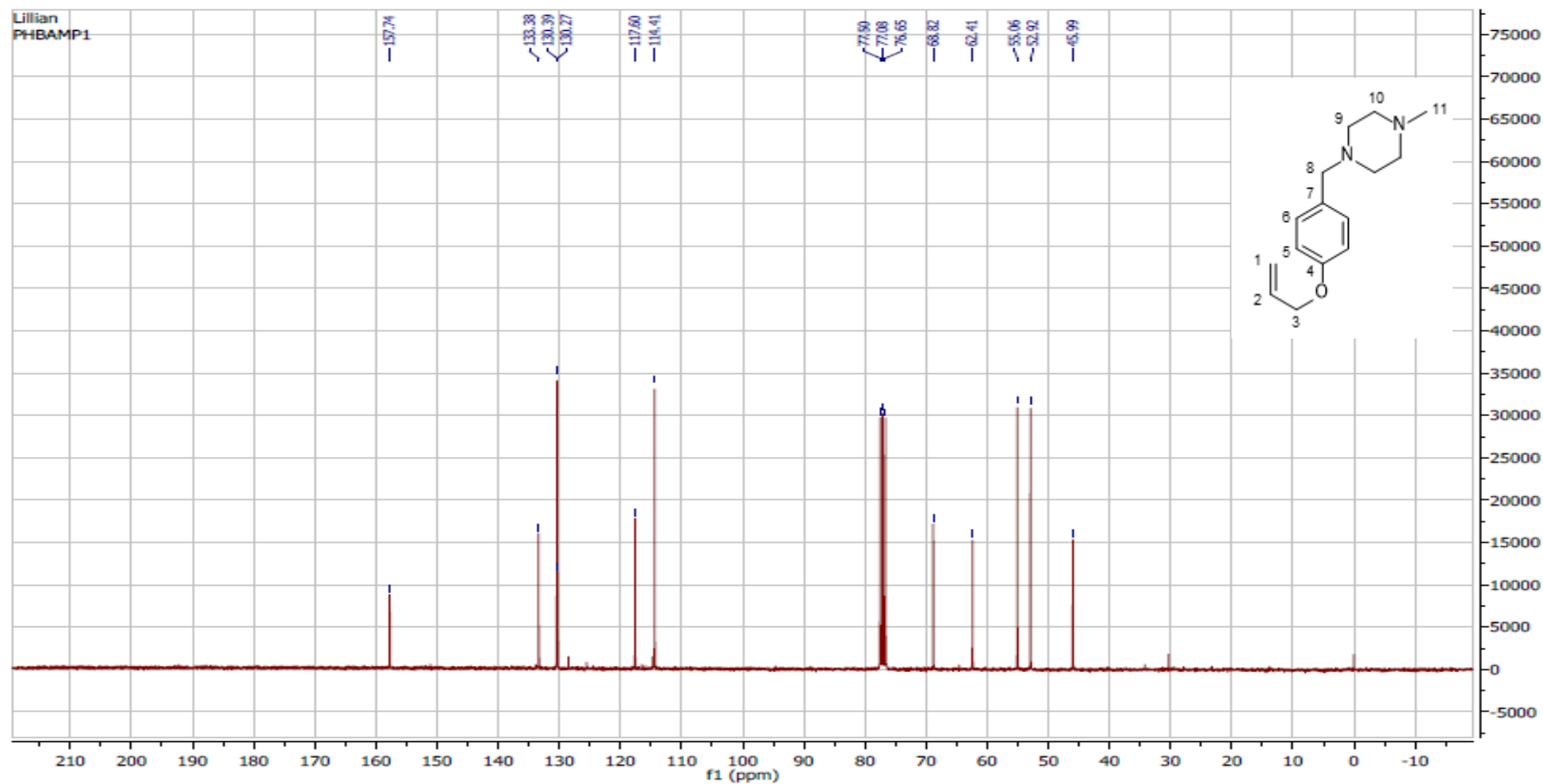
BG Mode: Calc. from Peak Group 1 - Event 1 Scan





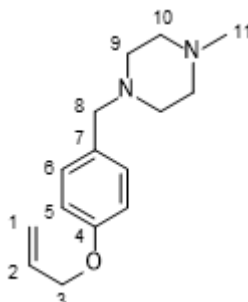


## APÊNDICE 30

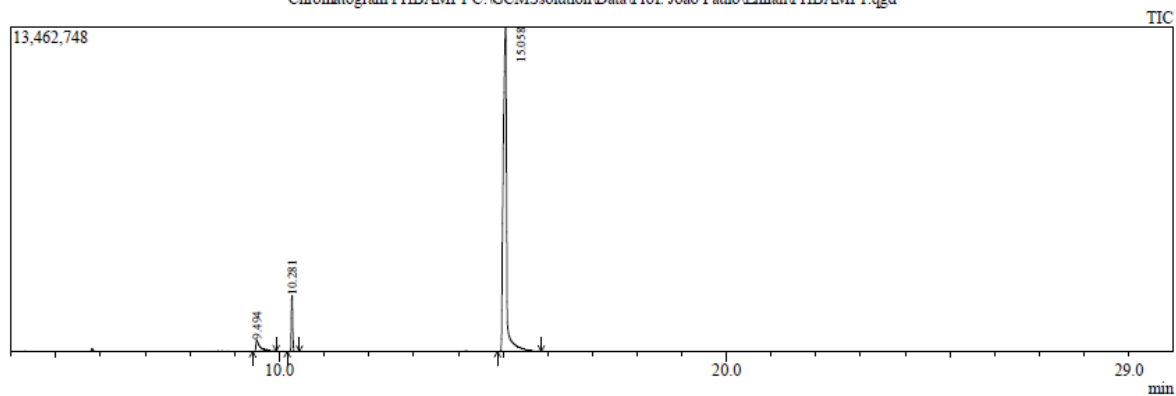


**5b**: Sólido branco.  $^{13}\text{C}$ -RMN (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz,  $\delta$  = ppm, TMS): 46,0 (C-11), 52,9 (C-9), 55,1 (C-10), 62,4 (C-8), 68,8 (C-3), 114,4 (C-1), 117,6 (C-2), 130,3 (C-6), 130,4 (C-5), 133,4 (C-7), 157,7 (C-4).

## APÊNDICE 31



Chromatogram PHBAMP1 C:\GCMSsolution\Data\Prof. João Paulo\Lillian\PHBAMP1.qgd



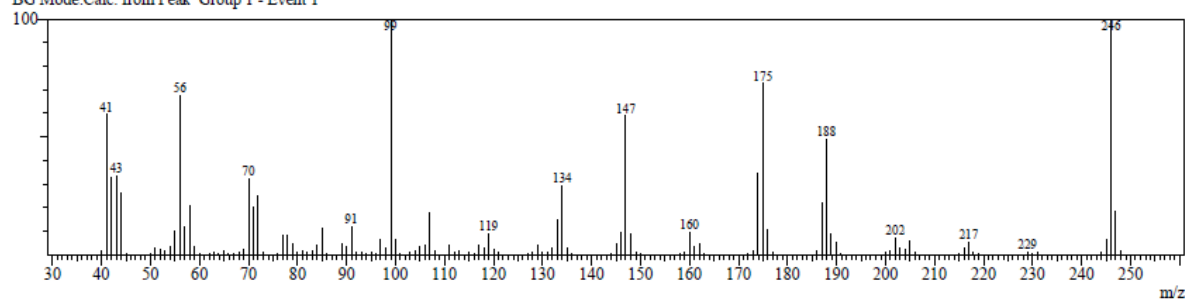
Peak Report TIC									
Peak#	R.Time	I.Time	F.Time	Area	Area%	Height	Height%	A/H	Mark
1	9.494	9.400	9.925	3122228	3.91	475138	2.92	6.57	MI
2	10.281	10.175	10.450	4782888	5.99	2323652	14.29	2.06	MI
3	15.058	14.875	15.858	71948963	90.10	13461720	82.79	5.34	MI
				79854079	100.00	16260510	100.00		

Line# 3 R.Time:15.058(Scan#:1328)

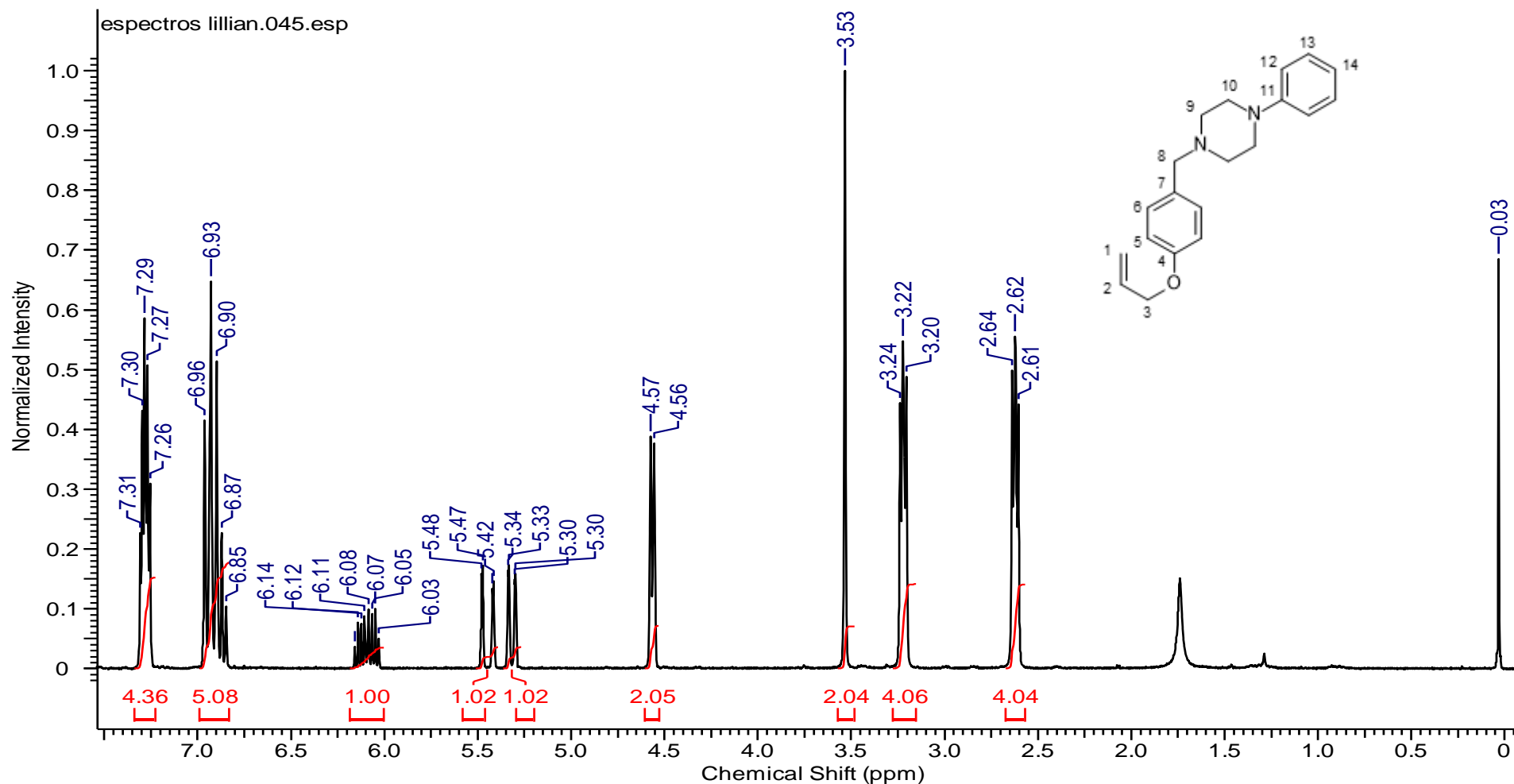
MassPeaks:139

RawMode:Averaged 15.050-15.067(1327-1329) BasePeak:246(1148777)

BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1

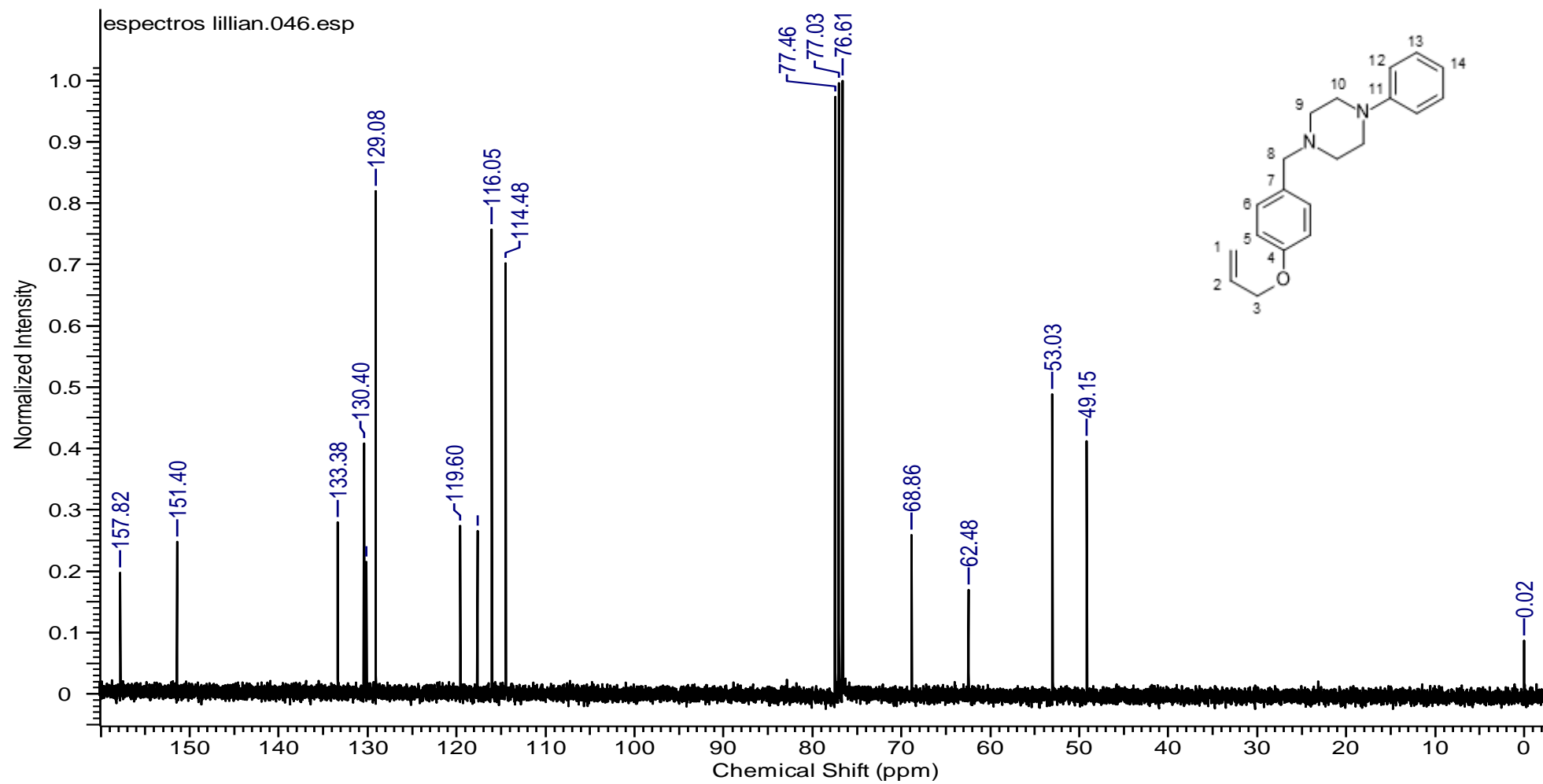


## APÊNDICE 32



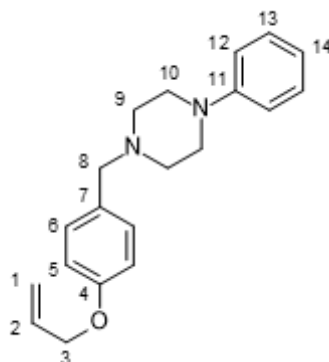
**6b**: Sólido branco.  $^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz,  $\delta$  = ppm, TMS): 2,60-2,65 (m, 4, H-9), 3,19-3,25 (m, 4H, H-10), 3,53 (s, 2H, H-8), 4,56 (dd,  $J$  = 3,9, 1,4 Hz, 2H, H-3), 5,32 (dd,  $J$  = 10,5, 1,4 Hz, 1H, H-1a), 5,45 (dd,  $J$  = 17,2, 1,4 Hz, 1H, H-1b), 6,05 (ddt,  $J$  = 17,2, 10,5, 5,3 Hz, 1H, H-2), 6,84-6,97 (m, H-5/12/14), 7,24-7,32 (m, H-6/13).

## APÊNDICE 33

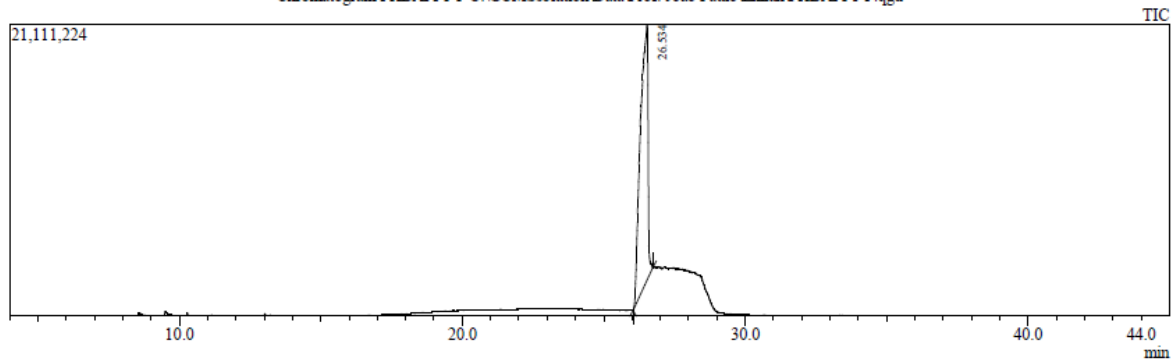


**6b**: Sólido branco.  $^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz,  $\delta$  = ppm, TMS): 49,2 (C-9), 53,0 (C-10), 62,5 (C-8), 68,9 (C-3), 114,5 (C-5), 116,0 (C-12), 117,7 (C-14), 119,6 (C-1), 129,0 (C-13), 130,2 (C-11), 130,4 (C-2), 133,4 (C-6), 151,4 (C-7), 157,8 (C-4).

# APÊNDICE 34



Chromatogram PHBAPP1-P C:\GCMSolution\Data\Prof. João Paulo\Lillian\PHBAPP1-P.qgd



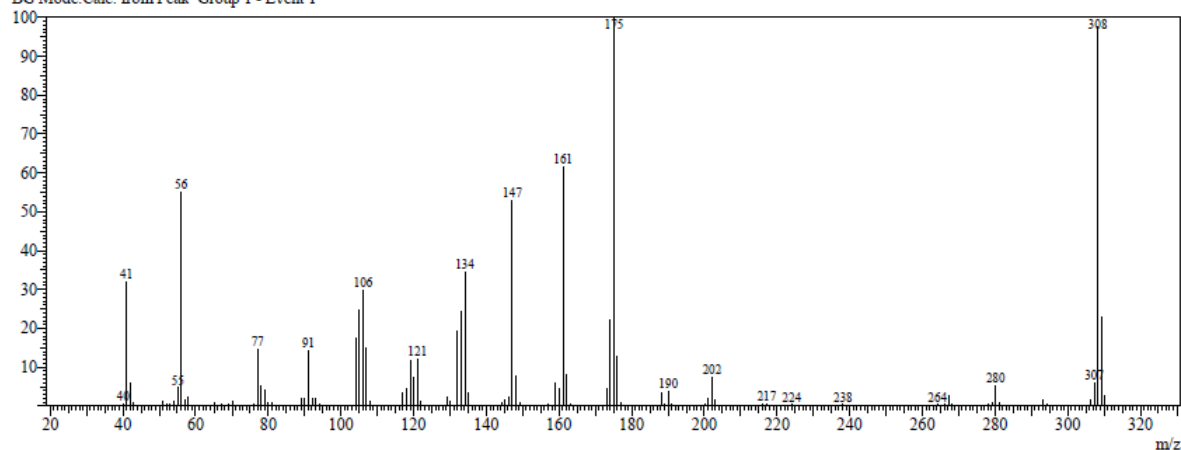
Peak Report TIC										
Peak#	R.Time	I.Time	F.Time	Area	Area%	Height	Height%	A/H	Mark	Name
1	26.534	26.042	26.750	354974346	100.00	18522881	100.00	19.16	MI	
				354974346	100.00	18522881	100.00			

Line#:1 R.Time:26.533(Scan#:2705)

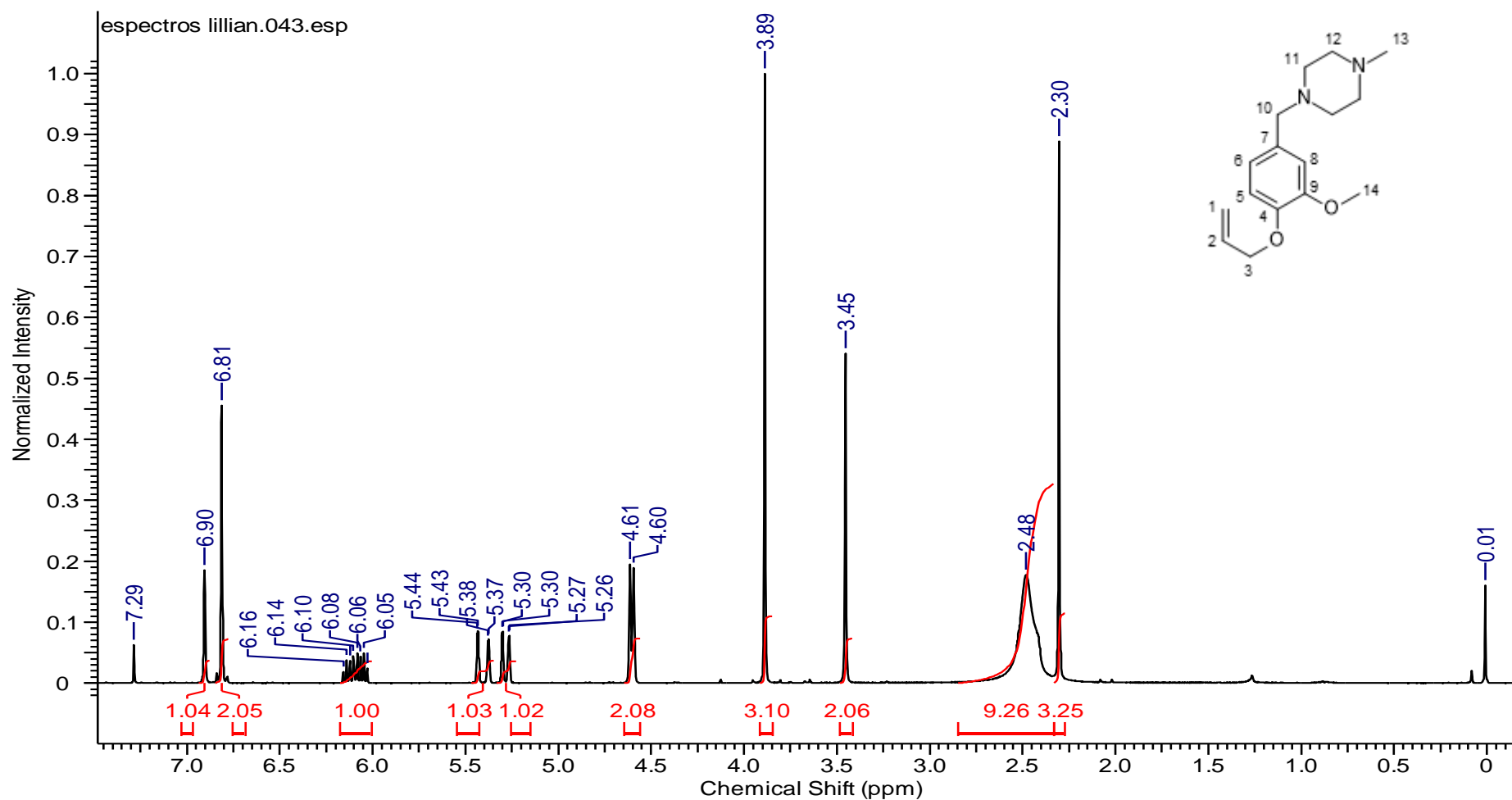
MassPeaks:163

RawMode:Averaged 26.525-26.542(2704-2706) BasePeak:175(2205806)

BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1

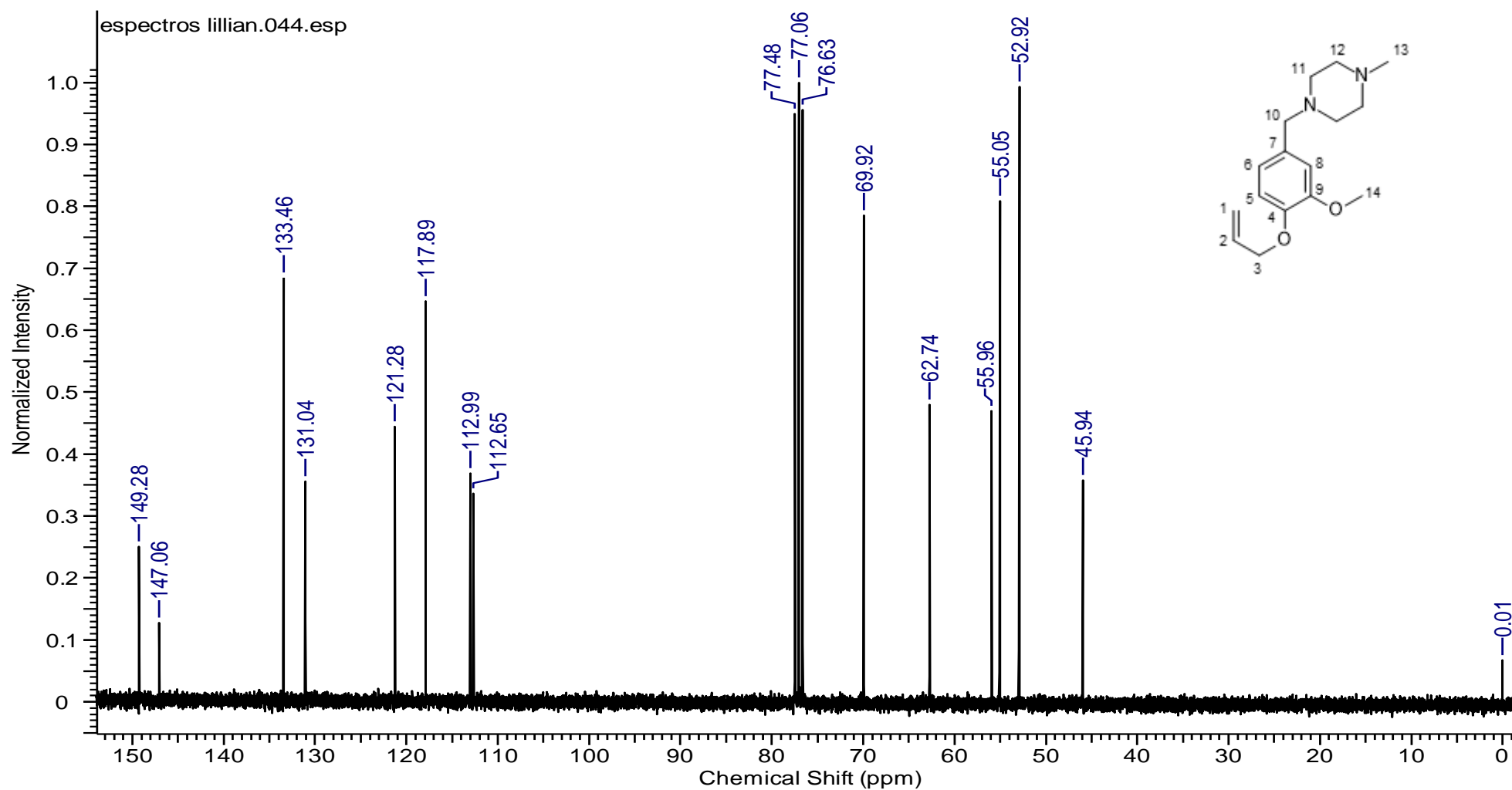


## APÊNDICE 35



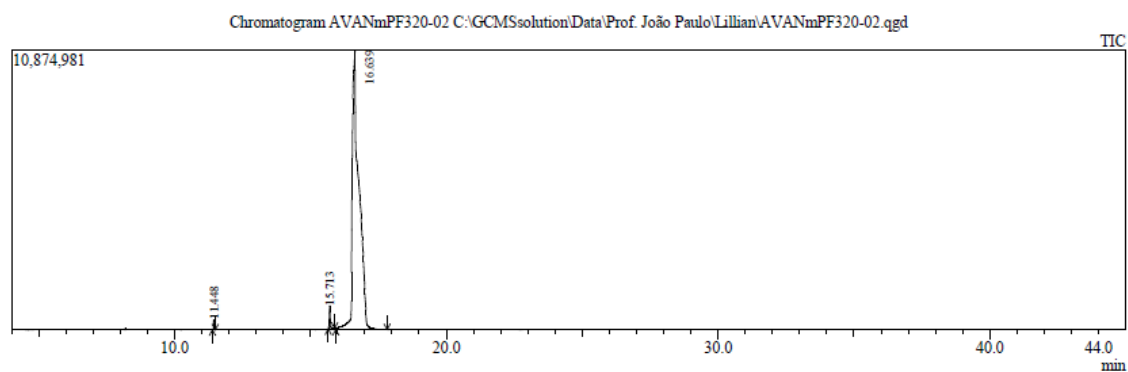
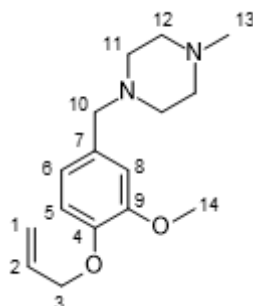
**5c:** Sólido branco.  $^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz,  $\delta$  = ppm, TMS): 2,30 (s, 3H, H-13), 2,48 (sl, 8H, H-11/12), 3,45 (s, 2H, H-10), 3,89 (s, 3H, H-14), 4,60 (dd,  $J$  = 3,9, 1,4 Hz, 2H, H-3), 5,28 (dd,  $J$  = 10,5, 1,4 Hz, 1H, H-1a), 5,41 (dd,  $J$  = 17,2, 1,4 Hz, 1H, H-1b), 6,06 (ddt,  $J$  = 17,2, 10,5, 5,3 Hz, 1H, H-2), 6,81 (m, 2H, H-5/6), 6,90 (s, 1H, H-8).

## APÊNDICE 36



**5c:** Sólido branco.  $^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz,  $\delta$  = ppm, TMS): 45,9 (C-13), 52,9 (C-11), 55,0 (C-12), 56,0 (C-14), 62,7 (C-10), 69,9 (C-3), 112,7 (C-5), 113,0 (C-1), 117,9 (C-2), 121,3 (C-6), 131,0 (C-7), 133,5 (C-8), 147,1 (C-9), 149,3 (C-4).

# APÊNDICE 37



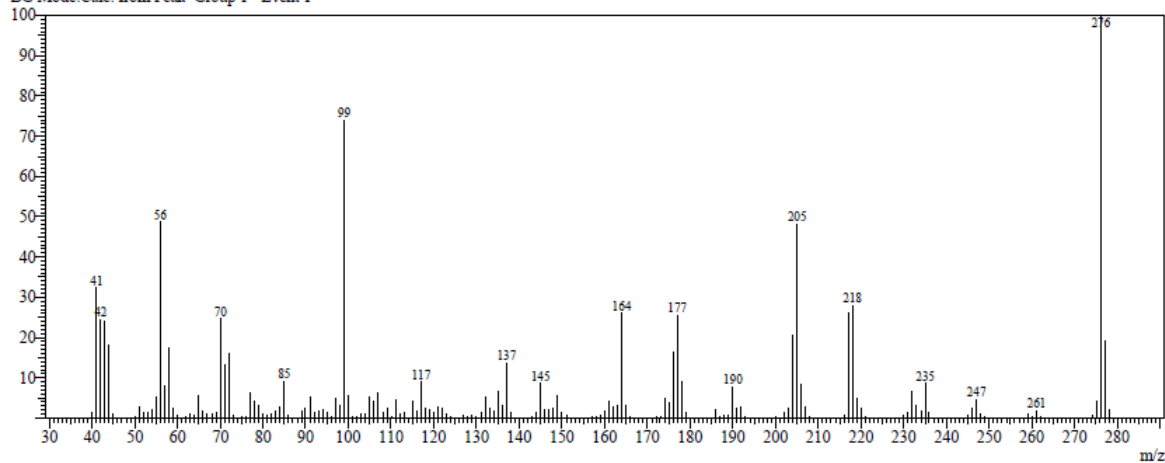
Peak Report TIC										
Peak#	R.Time	I.Time	F.Time	Area	Area%	Height	Height%	A/H	Mark	Name
1	11.448	11.400	11.500	783649	0.42	389662	3.21	2.01	MI	
2	15.713	15.658	15.900	2234130	1.18	893064	7.35	2.50	MI	
3	16.639	15.933	17.825	185786082	98.40	10863741	89.44	17.10	MI	
				188803861	100.00	12146467	100.00			

Line# 5 R.Time:16.642(Scan#:1518)

MassPeaks:177

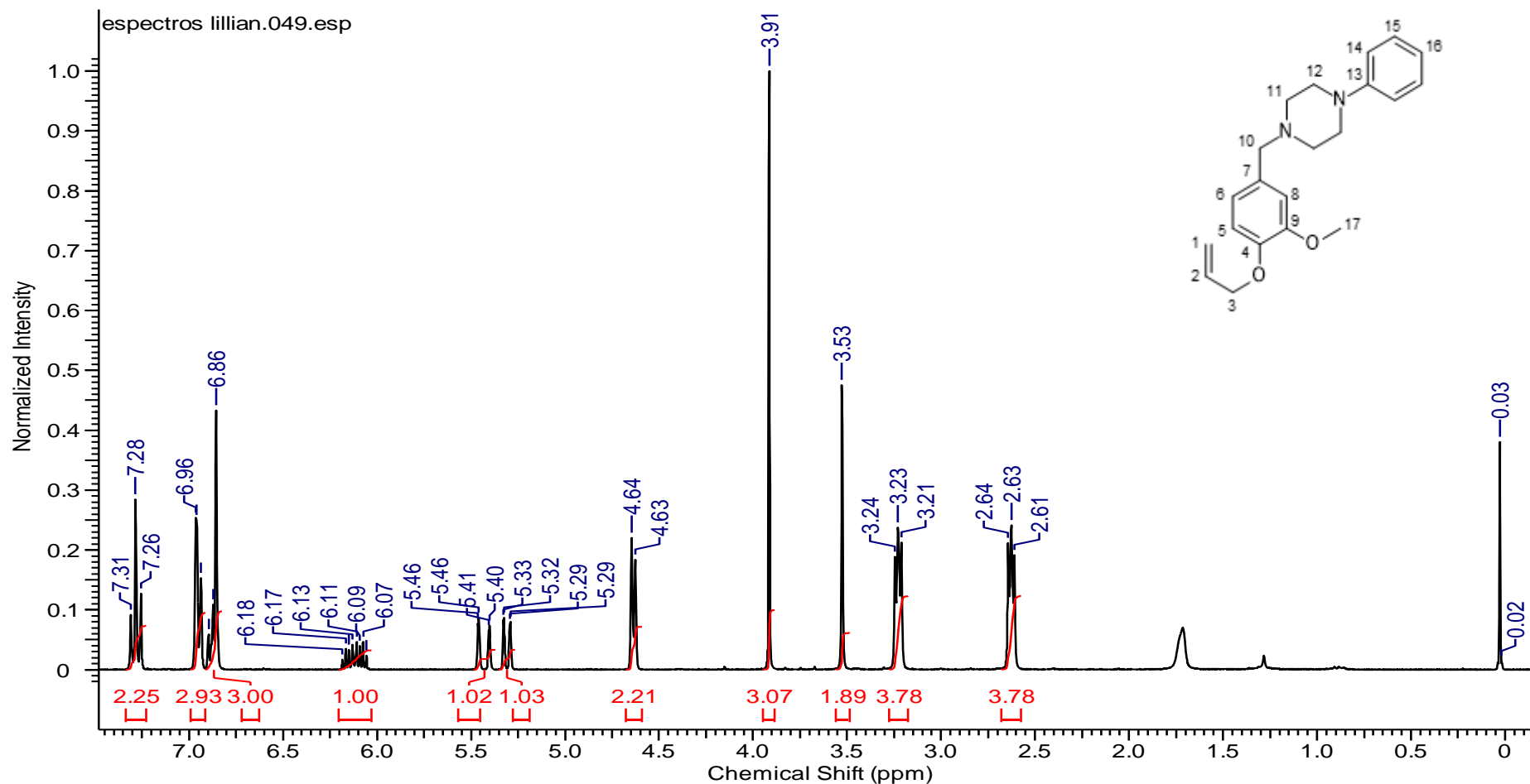
RawMode:Averaged 16.633-16.650(1517-1519) BasePeak:276(1108436)

BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1



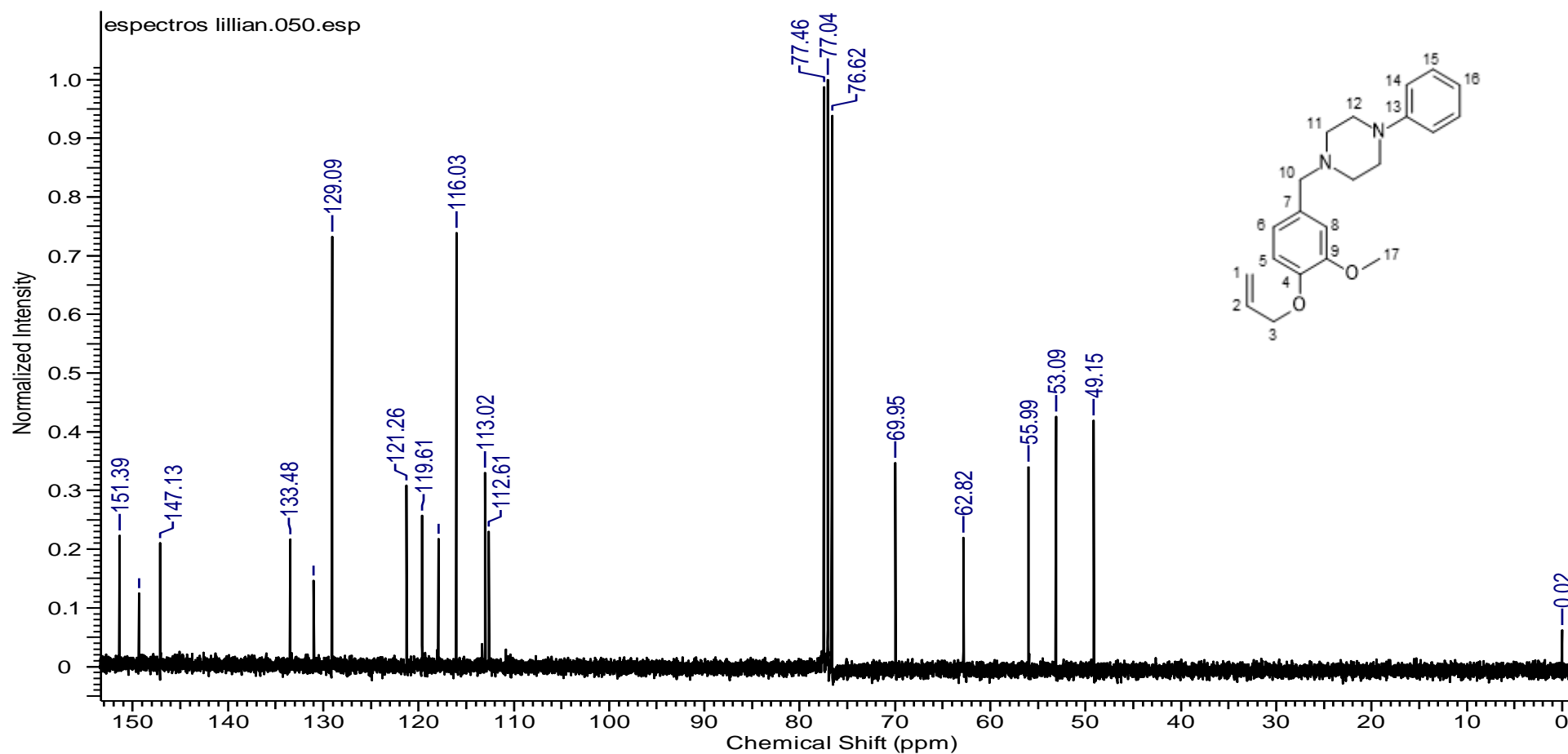


## APÊNDICE 38



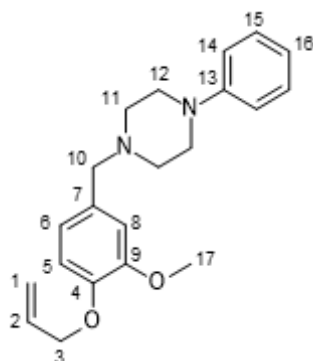
**6c**: Sólido branco.  $^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz,  $\delta$  = ppm, TMS): 2,60-2,65 (m, 4H, H-11), 3,20-3,25 (m, 4H, H-12), 3,53 (s, 2H, H-10), 3,91 (s, 3H, H-17), 4,63 (dd,  $J$  = 3,9, 1,4 Hz, 2H, H-3), 5,30 (dd,  $J$  = 10,5, 1,4 Hz, 1H, H-1a), 5,43 (dd,  $J$  = 17,2, 1,4 Hz, 1H, H-1b), 6,05 (ddt,  $J$  = 17,2, 10,5, 5,3 Hz, 1H, H-2), 6,84-6,90 (m, 3H, H-5/14), 6,92-6,99 (m, 3H, H-6/8/16), 7,24-7,33 (m, 2H, H-15).

## APÊNDICE 39

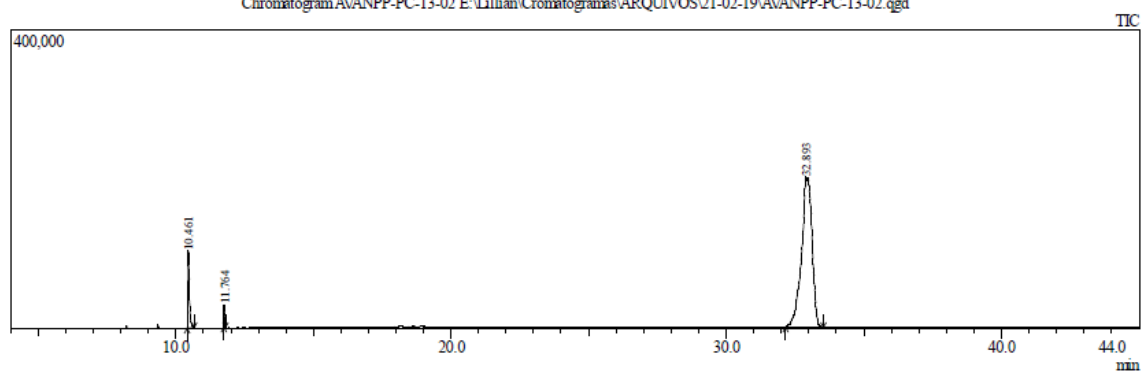


**6c:** Sólido branco.  $^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz,  $\delta$  = ppm, TMS): 49,1 (C-11), 53,1 (C-12), 56,0 (C-17), 62,8 (C-10), 70,0 (C-3), 112,6 (C-5), 113,0 (C-1), 116,0 (C-14), 117,9 (C-16), 119,6 (C-2), 121,3 (C-6), 129,1 (C-15), 131,0 (C-7), 133,5 (C-8), 147,1 (C-9), 149,4 (C-13), 151,4 (C-4).

## APÊNDICE 40



Chromatogram AVANPP-PC-13-02 E:\Lillian\Cromatogramas\ARQUIVOS\21-02-19\AVANPP-PC-13-02.qgd



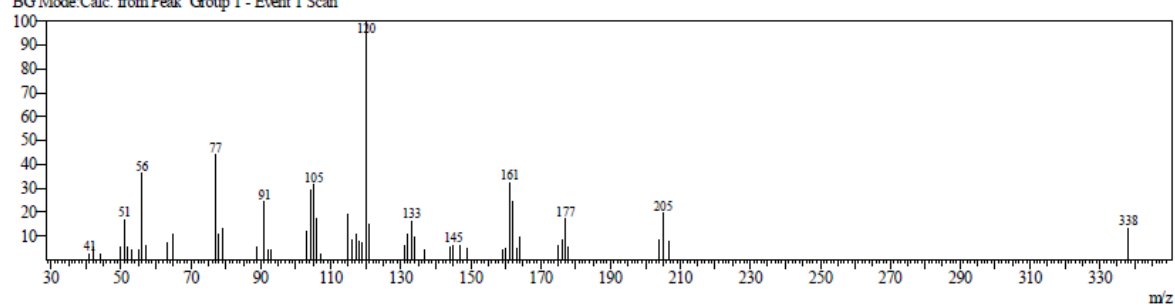
Peak#	R.Time	I.Time	F.Time	Area	Area%	Height	Height%	A/H	Mark	Name
1	10.461	10.417	10.675	365477	6.25	103200	30.83	3.54	MI	
2	11.764	11.742	11.800	57438	0.98	30108	8.99	1.91	MI	
3	32.893	32.158	33.542	5427814	92.77	201449	60.18	26.94	MI	
				5850729	100.00	334757	100.00			

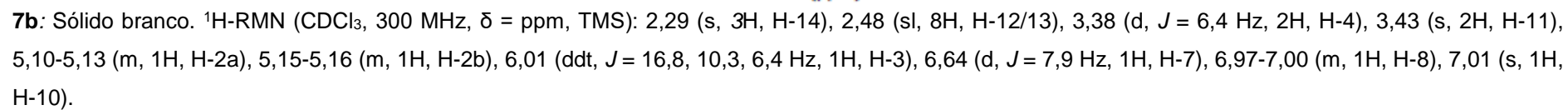
Line# 3 R.Time: 32.892 (Scan#: 3468)

MassPeaks: 54

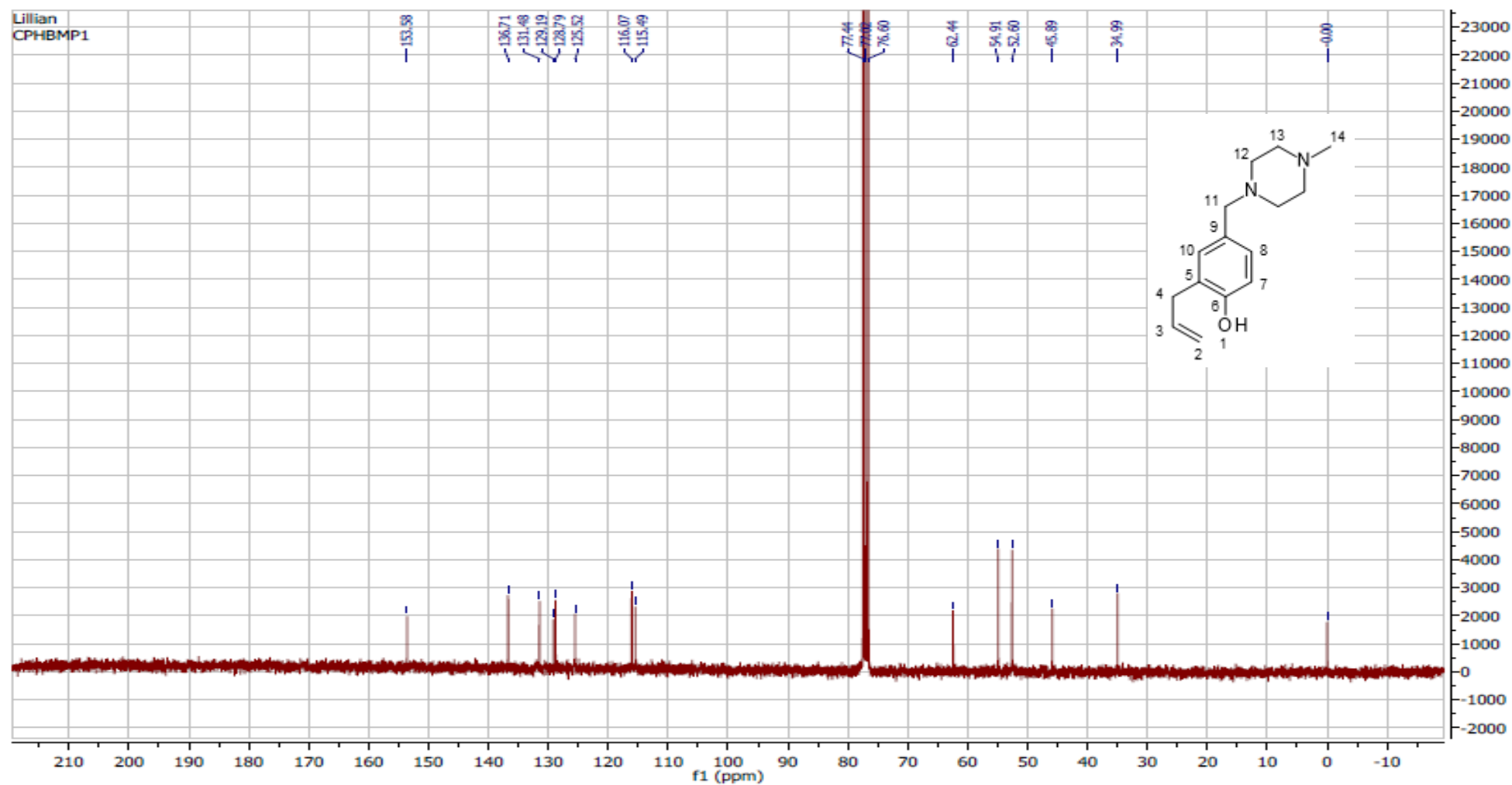
RawMode: Averaged 32.883-32.900 (3467-3469) BasePeak: 120 (28258)

BG Mode: Calc. from Peak Group 1 - Event 1 Scan



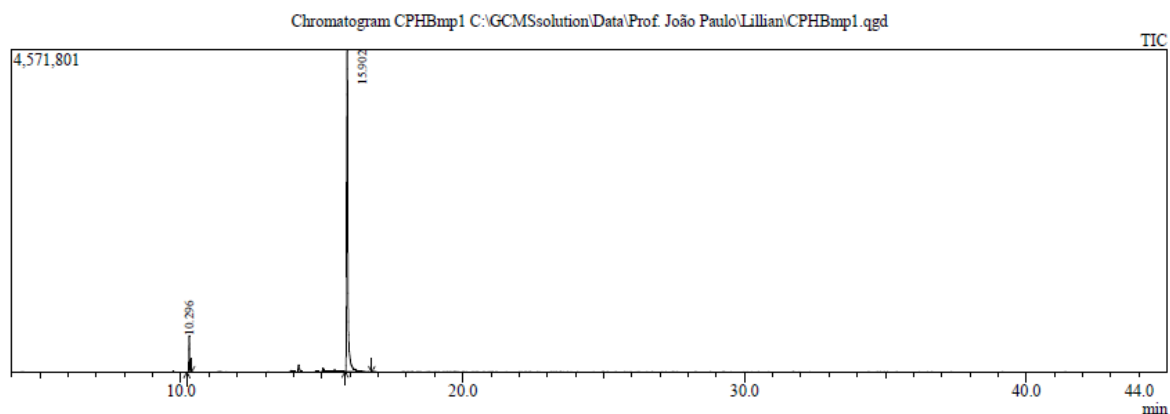
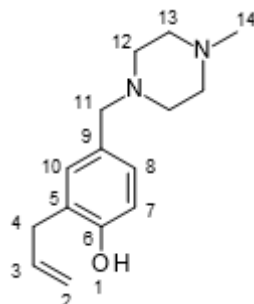


## APÊNDICE 42



**7b**: Sólido branco. <sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz, δ = ppm, TMS): 35,0 (C-4), 45,9 (C-14), 52,6 (C-12), 54,9 (C-13), 62,4 (C-11), 115,5 (C-7), 116,1 (C-2), 125,5 (C-5), 128,8 (C-8), 129,2 (C-9), 131,5 (C-10), 136,7 (C-3), 153,6 (C-6).

# APÊNDICE 43



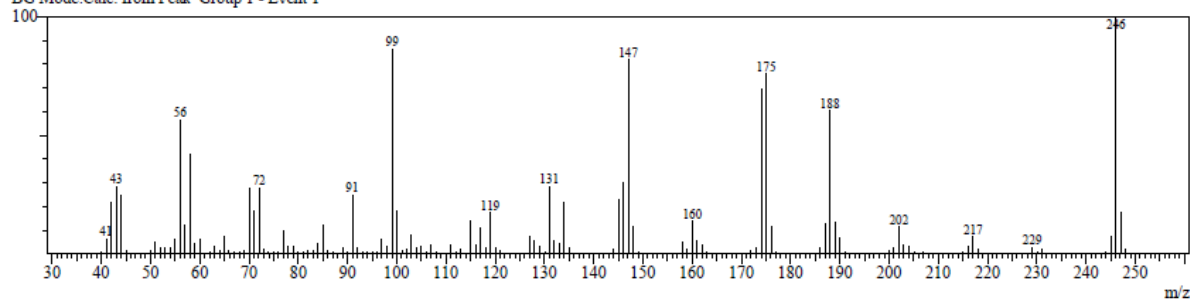
Peak Report TIC									
Peak#	R. Time	I. Time	F. Time	Area	Area%	Height	Height%	A/H	Mark Name
1	10.296	10.217	10.375	1011408	6.57	518691	10.21	1.95	MI
2	15.902	15.833	16.767	14392229	93.43	4563448	89.79	3.15	MI
				15403637	100.00	5082139	100.00		

Line#:2 R. Time:15.900(Scan#:1429)

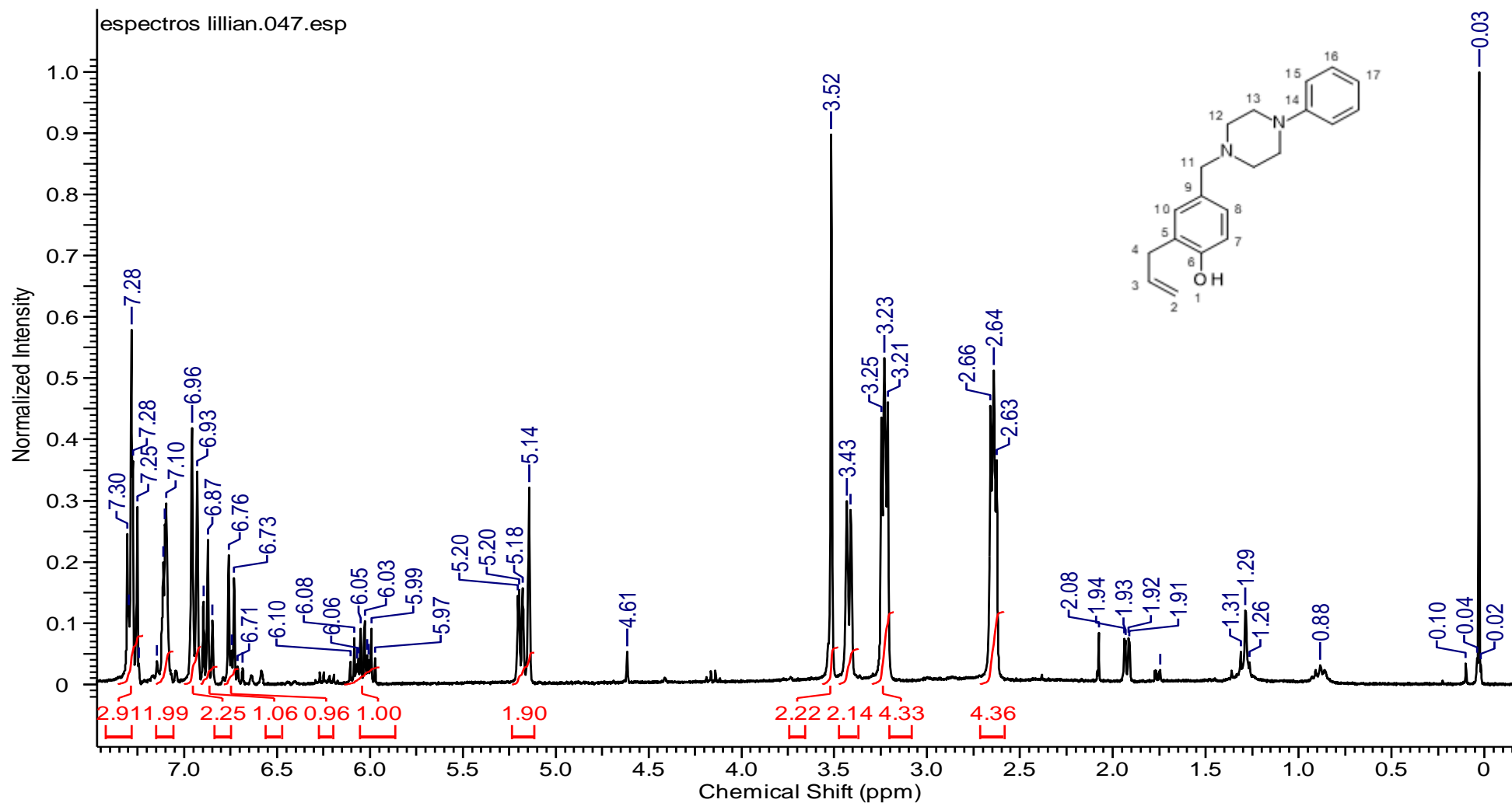
MassPeaks:136

RawMode:Averaged 15.892-15.908(1428-1430) BasePeak:246(335015)

BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1

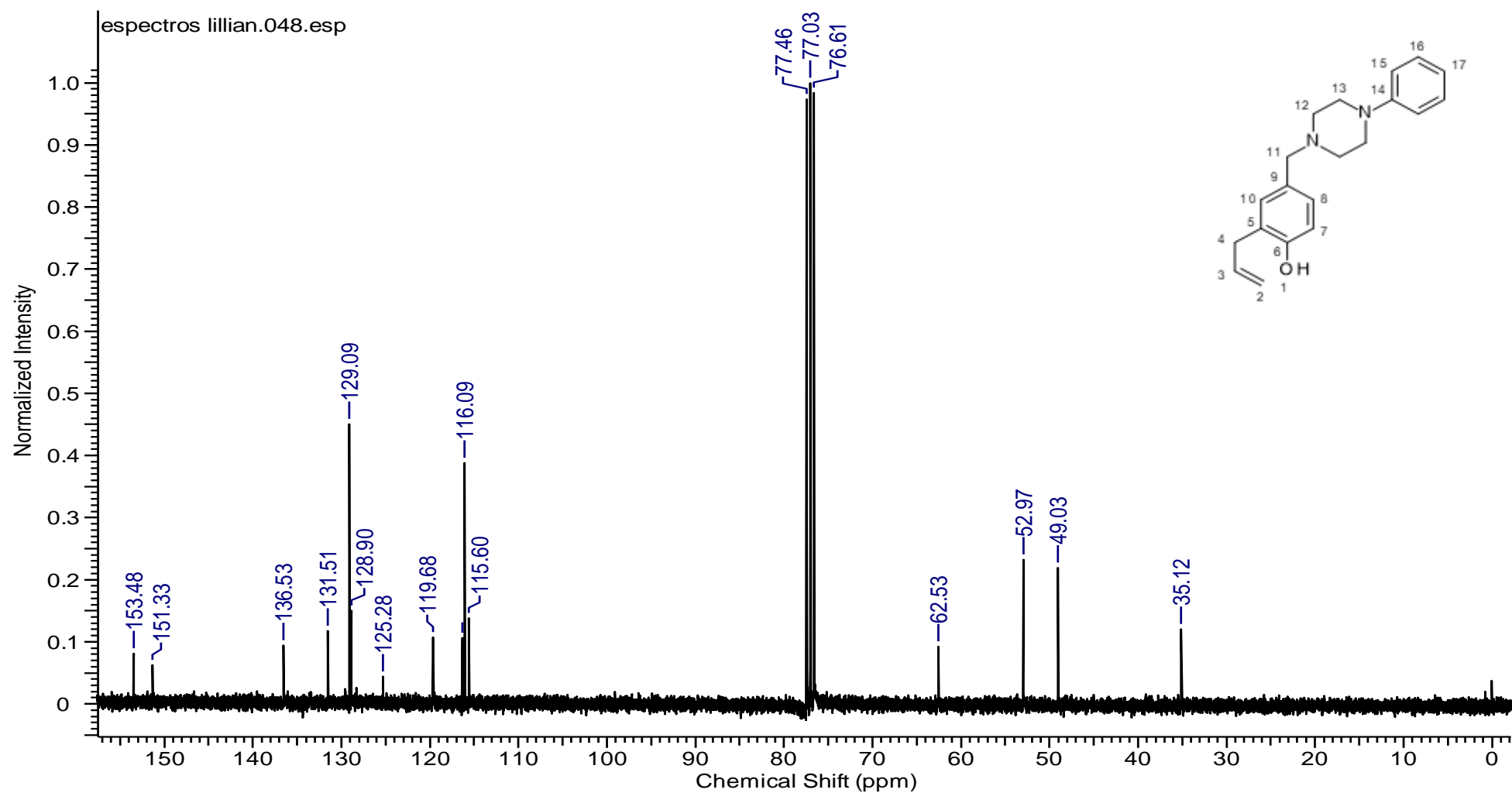


## APÊNDICE 44



**8b**: Sólido branco.  $^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz,  $\delta$  = ppm, TMS): 2,61-2,68 (m, 4H, H-12), 3,19-3,27 (m, 4H, H-13), 3,42 (d,  $J$  = 6,4 Hz, 2H, H-4), 3,52 (s, 2H, H-11), 5,13-5,20 (m, 2H, H-2), 6,05 (m, 1H, H-3), 6,75 (d,  $J$  = 7,9 Hz, 1H, H-7), 6,87 (t,  $J$  = 7,4 Hz, H-17), 6,95 (d,  $J$  = 8,1 Hz, 2H, H-15), 7,08-7,15 (m, 2H, H-16), 7,24-7,32 (m, 2H, H8/10).

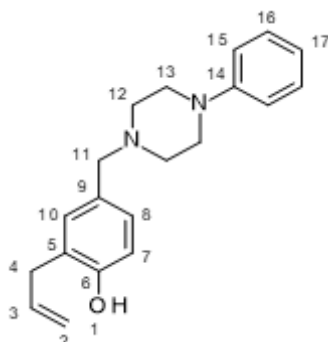
## APÊNDICE 45



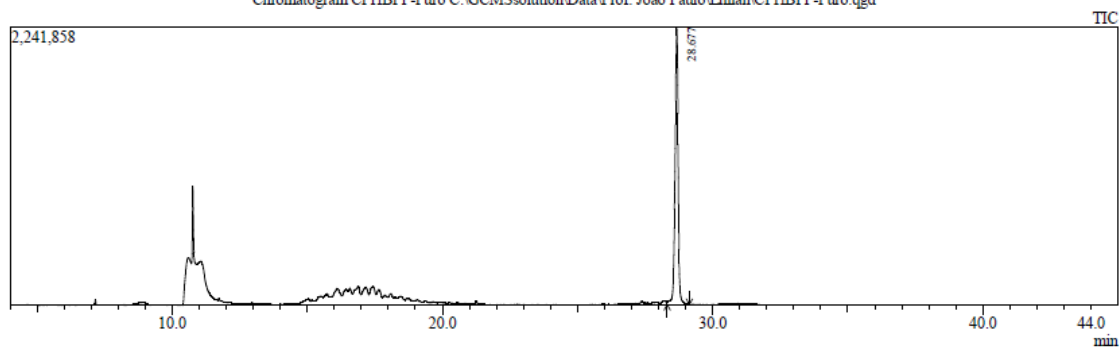
<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz, δ = ppm, TMS): 35,1 (C-4), 49,0 (C-12), 53,0 (C-13), 62,5 (C-11), 115,6 (C-7), 116,1 (C-15), 116,4 (C-17), 119,7 (C-2), 125,3 (C-5), 128,9 (C-8), 129,1 (C-16), 129,6 (C-9), 131,5 (C-10), 136,5 (C-3), 151,3 (C-14), 153,5 (C-6).



## APÊNDICE 46



Chromatogram CPHBPP-Puro C:\GCMSolution\Data\Prof. João Paulo\Lillian\CPHBPP-Puro.qgd



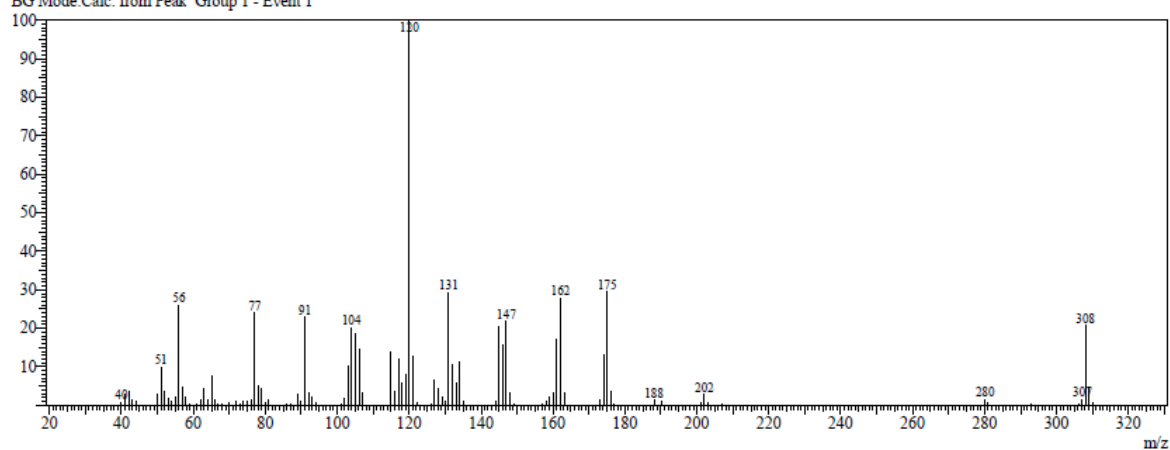
Peak Report TIC									
Peak#	R.Time	I.Time	F.Time	Area	Area%	Height	Height%	A/H	Mark
1	28.677	28.317	29.142	18132556	100.00	2233416	100.00	8.12	MI
				18132556	100.00	2233416	100.00		Name

Line#:1 R.Time:28.675(Scan#:2962)

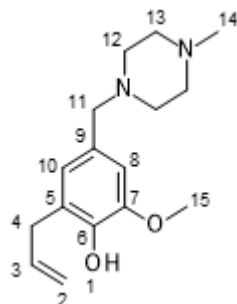
MassPeaks:101

RawMode:Averaged 28.667-28.683(2961-2963) BasePeak:120(333578)

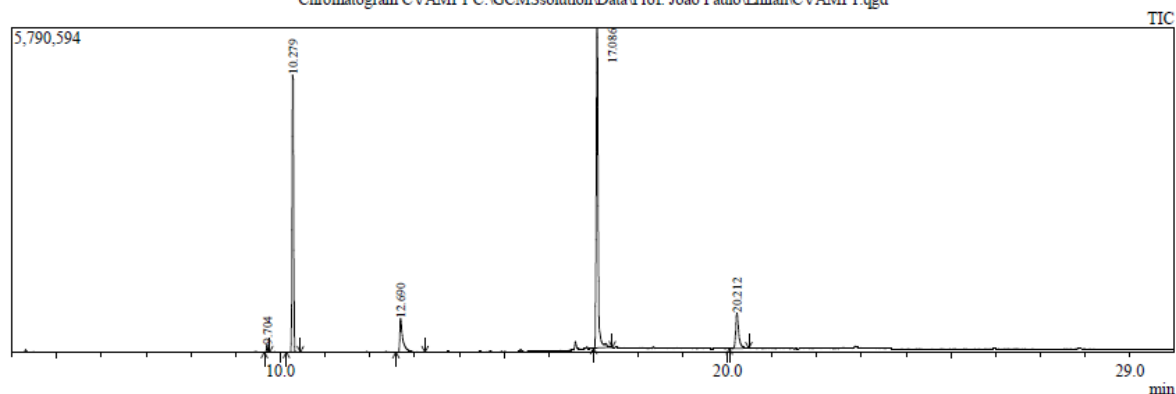
BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1



## APÊNDICE 47



Chromatogram CVAMP1 C:\GCMSsolution\Data\Prof. João Paulo\Lillian\CVAMP1.qgd



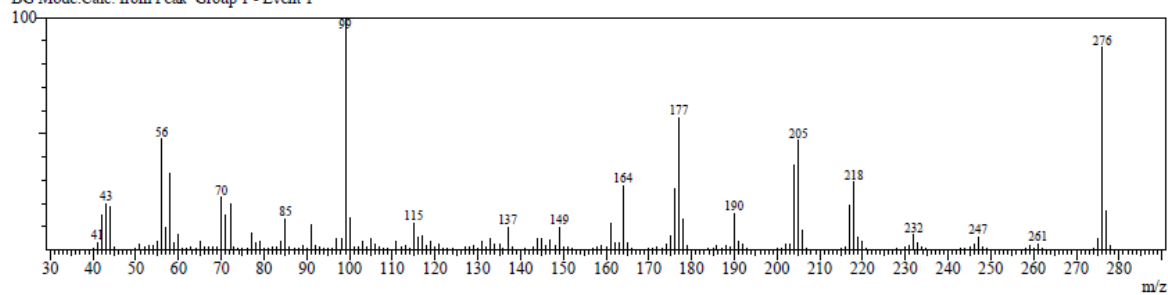
Peak#	R.Time	I.Time	F.Time	Area	Area%	Height	Height%	A/H	Mark	Name
1	9.704	9.642	9.758	226562	0.66	130883	1.09	1.73	MI	
2	10.279	10.133	10.450	11493364	33.34	4956879	41.17	2.32	MI	
3	12.690	12.583	13.233	2847445	8.26	606542	5.04	4.69	MI	
4	17.086	17.008	17.425	16940494	49.13	5714367	47.47	2.96	MI	
5	20.212	20.042	20.475	2969969	8.61	630043	5.23	4.71	MI	
				34477834	100.00	12038714	100.00			

Line#4 R.Time:17.083(Scan#:1571)

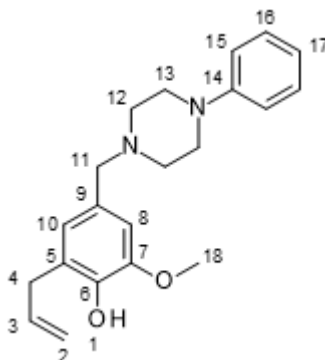
MassPeaks:178

RawMode:Averaged 17.075-17.092(1570-1572) BasePeak:99(530917)

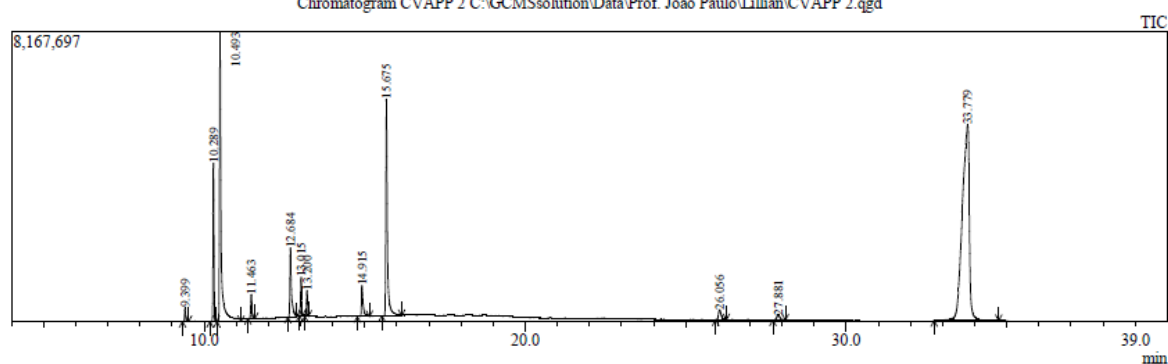
BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1



## APÊNDICE 48



Chromatogram CVAPP 2 C:\GCMSsolution\Data\Prof. João Paulo\Lillian\CVAPP 2.qgd



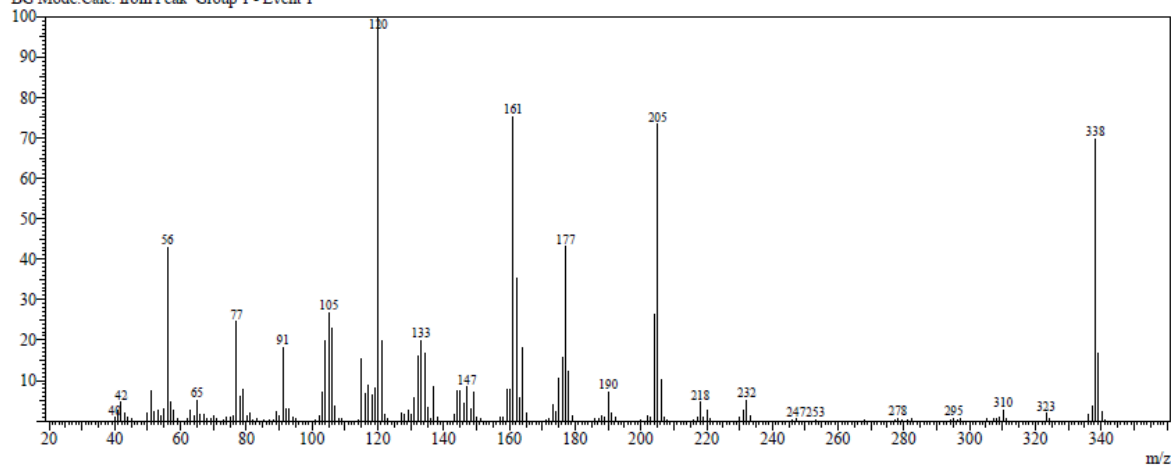
Peak#	R.Time	I.Time	F.Time	Area	Area%	Height	Height%	A/H	Mark	Name
1	9.399	9.325	9.517	985024	0.59	387335	1.28	2.54	MI	
2	10.289	10.183	10.375	10016267	5.98	4469782	14.71	2.24	MI	
3	10.493	10.400	11.142	30891365	18.43	8166618	26.88	3.78	MI	
4	11.463	11.358	11.575	1755257	1.05	679515	2.24	2.58	MI	
5	12.684	12.608	12.867	7136522	4.26	1944993	6.40	3.67	MI	
6	13.015	12.967	13.058	2262509	1.35	1077965	3.55	2.10	MI	
7	13.200	13.133	13.250	1513765	0.90	725095	2.39	2.09	MI	
8	14.915	14.767	15.150	3321951	1.98	878714	2.89	3.78	MI	
9	15.675	15.533	16.150	21986909	13.12	6106296	20.10	3.60	MI	
10	26.056	25.933	26.267	1625625	0.97	274629	0.90	5.92	MI	
11	27.881	27.717	28.108	1055304	0.63	145474	0.48	7.25	MI	
12	33.779	32.742	34.750	85079667	50.75	5522481	18.18	15.41	MI	

Line#:12 R.Time:33.775(Scan#:3574)

MassPeaks:157

RawMode:Averaged 33.767-33.783(3573-3575) BasePeak:120(530184)

BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1



## ANEXO A – Permissão de reprodução das figuras

*Council***Edward T. Morgan**

*President*  
Emory University School of  
Medicine

**Wayne L. Backes**

*President-Elect*  
Louisiana State University Health  
Sciences Center

**John D. Schuetz**

*Past President*  
St. Jude Children's Research  
Hospital

**Margaret E. Gnegy**

*Secretary/Treasurer*  
University of Michigan Medical  
School

**Jin Zhang**

*Secretary/Treasurer-Elect*  
University of California, San Diego

**John J. Tesmer**

*Past Secretary/Treasurer*  
Purdue University

**Carol L. Beck**

*Councilor*  
Thomas Jefferson University

**Alan V. Smrcka**

*Councilor*  
University of Michigan Medical  
School

**Kathryn A. Cunningham**

*Councilor*  
University of Texas Medical  
Branch

**Mary E. Vore**

*Chair, Board of Publications  
Trustees*  
University of Kentucky

**Brian M. Cox**

*FASEB Board Representative*  
Bethesda, MD

**Michael W. Wood**

*Chair, Program Committee*  
Neupharm LLC

**Judith A. Siuciak**

*Executive Officer*

April 26, 2019

Lillian Ferreira dos Santos Nascimento  
Pharmaceutical Sciences  
Federal University of São Paulo  
Rua São Nicolau, 210  
Diadema  
São Paulo  
Brazil

Email: nascimento.lillian@yahoo.com

Dear Lillian Nascimento:

This is to grant you permission to reproduce the following figure in your thesis titled "New LINS01 Series Aril-Methyl-Piperazines as H3R/H4R Histamine Receptor Ligands" for the Federal University of São Paulo:

Figure 3 from P Panula, PL Chazot, M Cowart, R Gutzmer, R Leurs, WLS Liu, H Stark, RL Thurmond, and HL Haas (2015) International Union of Basic and Clinical Pharmacology. XCVIII. Histamine Receptors, *Pharmacol Rev*, 67(3): 601-655; DOI: <https://doi.org/10.1124/pr.114.010249>

Permission to reproduce the figure is granted for one-time use in any format or medium including print and electronic. The authors and the source of the materials must be cited in full, including the article title, journal title, volume, year, and page numbers.

Sincerely yours,

Richard Dodenhoff  
Journals Director

Transforming Discoveries into Therapies

ASPET · 1801 Rockville Pike, Suite 210 · Rockville, MD 20852 · Office: 301-634-7060 · [aspet.org](http://aspet.org)

